

Université de Montréal

**Relation entre CaMKII et les dynamiques calciques endothéliales:  
Impact de l'hypertension artérielle.**

par  
Chimène Charbel

Département de Pharmacologie  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D)  
en Pharmacologie

Avril 2015

© Chimène Charbel, 2015

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Relation entre CaMKII et les dynamiques calciques endothéliales: Impact de  
l'hypertension artérielle.**

Présenté par :

Chimène Charbel

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Éric Thorin, président-rapporteur

.....

Dr Jonathan Ledoux, directeur de recherche

.....

Dr Jean-Philippe Gratton, membre du jury

.....

Dr Normand Leblanc, examinateur externe

.....

## Résumé

L'endothélium vasculaire joue un rôle prépondérant dans la régulation du tonus vasculaire en générant l'oxyde nitrique (NO), la prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ) et les facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium (EDHF) comme puissants vasodilatateurs. Ces mécanismes requièrent le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) à divers niveaux, démontrant l'importance des dynamiques calciques endothéliales. Une perturbation de l'homéostasie calcique est observée dans une dysfonction endothéliale liée à l'hypertension artérielle. Il est impératif d'approfondir nos connaissances sur les signalisations calciques endothéliales impliquées dans le contrôle du tonus vasculaire.

Des études récentes ont montré qu'une variation locale de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracellulaire ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) est suffisante pour générer une réponse physiologique importante. Les pulsars calciques sont caractérisés par une augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  spontanée et transitoire spécifiquement localisée au niveau des projections myoendothéliales (PMEs). Ces PMEs sont des sites de communication privilégiés entre les cellules endothéliales (CEs) et les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs). Les pulsars calciques sont impliqués dans le mécanisme de l'EDHF *via* l'activation des canaux potassiques  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendant de moyenne conductance ( $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  ou  $\text{IK}_{\text{Ca}}$ ). Les travaux de cette thèse visent à améliorer nos connaissances sur les signalisations calciques locales en caractérisant une nouvelle voie de signalisation pouvant être impliquée dans la régulation du tonus vasculaire en condition physiopathologique. Outre les canaux  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  peu d'informations sont disponibles sur les cibles sensibles aux pulsars calciques. Une première étude a permis d'identifier la protéine kinase II dépendante du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline (CaMKII) sous ses isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$  dans les CEs d'artères natives de souris comme une cible pouvant être modulée par les pulsars calciques. Des études en immunofluorescence ont permis d'observer la localisation particulière de CaMKII endothéliale dans les PMEs, les sites des pulsars calciques. Une stimulation spécifique des pulsars calciques par la phényléphrine (PE) engendre un recrutement de CaMKII dans les PMEs. Sachant que CaMKII active l'oxyde nitrique synthase endothéliale (NOS3), nous avons évalué l'impact d'une stimulation des pulsars calciques sur la production de NO en présence d'un inhibiteur de CaMKII, le KN-93. Nous avons démontré que la production de NO est en partie dépendante de l'activation de CaMKII par les pulsars calciques. En utilisant un modèle d'hypertension induite par l'infusion chronique de PE, nous

avons permis de mettre en évidence une perturbation dans la relation entre les pulsars calciques et CaMKII. Dans une seconde étude nous avons établi deux modèles (normo- et hypertendus) d'infusion chronique à l'angiotensine II (AngII) afin d'évaluer l'impact des ROS et de l'hypertension sur la voie de signalisation pulsars/CaMKII/NO. Nos résultats ont montré une augmentation des pulsars calciques accompagnée d'un recrutement de CaMKII dans les PMEs. Une stimulation aigue à l'AngII suggère que les ROS modulent les dynamiques calciques et que l'AngII stimule la production de NO. Cette étude propose que ces voies de signalisations impliquent les récepteurs de type 1 et 2 à l'AngII (AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>).

L'étude des pulsars calciques dépend fortement de la structure native des artères qui permet de conserver la formation des PMEs. La dernière étude présentée dans cette thèse a permis d'établir une relation entre les PMEs et les pulsars calciques dans trois lits vasculaires distincts (artères mésentériques, pulmonaires et coronariennes). Nos résultats ont montré que les paramètres cinétiques des pulsars calciques sont fortement conservés entre les différents lits vasculaires. Toutefois, la fréquence globale ainsi que le nombre de sites actifs des pulsars calciques diffèrent avec une proportion plus élevée dans les artères mésentériques et coronariennes comparativement aux artères pulmonaires. Ces résultats corrélerent avec le nombre plus élevé de PMEs retrouvé dans les artères mésentériques et coronariennes. Ces travaux suggèrent que les pulsars calciques sont fondamentaux pour les artères de résistance.

Les études de cette thèse ont mené à l'identification d'une nouvelle voie de signalisation impliquant les pulsars calciques et CaMKII endothéliale dans la stimulation de la production de NO. Cette nouvelle voie de signalisation pourrait être impliquée dans la régulation du tonus vasculaire en condition physiopathologique. Les pulsars calciques semblent être fortement conservés entre les différentes artères de résistances et ce malgré la disparité dans les PMEs, suggérant un rôle prépondérant dans la fonction vasculaire. Ces travaux ouvrent une avenue pour le développement de potentielles cibles thérapeutiques pouvant contrer la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension artérielle.

**Mots-clés :** Signalisation calcique locale, pulsars calciques, projections myoendothéliales, CaMKII, oxyde nitrique, espèces réactives à l'oxygène, endothélium vasculaire, angiotensine II, hypertension artérielle.

## Abstract

In humans and in various animal models, the pathology of hypertension is often associated with an endothelial dysfunction characterized by a loss of balance between vasodilator and vasoconstrictor factors derived from the endothelium. The vascular endothelium plays a crucial role in the regulation of vascular tone by synthesizing and releasing NO, PGI<sub>2</sub> and EDHF as potent vasodilators. These mechanisms require Ca<sup>2+</sup> at different levels, showing the importance of endothelial calcium dynamics and their signaling pathways in endothelial function. Moreover, an alteration in Ca<sup>2+</sup> homeostasis is observed in endothelial dysfunction associated with hypertension. Therefore, it is imperative to increase our knowledge on the various endothelial Ca<sup>2+</sup> signaling involved in the control of vascular tone.

Recent studies show that local change in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> is sufficient to generate a significant physiological response. Ca<sup>2+</sup> pulsars are characterized by a spontaneous and transient increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> specifically localized within myoendothelial projections (MEPs). Those MEPs are privileged communication sites between endothelial cells (ECs) and vascular smooth muscle cells (VSMCs). Ca<sup>2+</sup> pulsars are involved in the EDHF mechanism through activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent potassium channels K<sub>Ca</sub>3.1, suggesting a role in modulation of VSMCs contractility. This thesis aims to improve our knowledge on local Ca<sup>2+</sup> signaling by characterizing a new signaling pathway that might be involved in the regulation of vascular tone in physiopathology. So far, besides K<sub>Ca</sub>3.1 channels, little information is known on targets sensitive to Ca<sup>2+</sup> pulsars. Thus, a first study identified the CaMKII as an attractive target that can be modulated by Ca<sup>2+</sup> pulsars in native ECs from mesenteric arteries. CaMKII has the ability to decode Ca<sup>2+</sup> oscillations similar to Ca<sup>2+</sup> pulsars. This study first demonstrated that CaMKII is expressed in its isoforms  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\delta$  in mice mesenteric arteries. Then, immunofluorescence studies have showed the particular localization of endothelial CaMKII within MEPs (Ca<sup>2+</sup> pulsars sites). In addition, specific stimulation of Ca<sup>2+</sup> pulsars with PE generates a recruitment of CaMKII within MEPs. Data from the literature suggest that CaMKII activates the NOS3, we evaluated the impact of Ca<sup>2+</sup> pulsars stimulation on NO production in the presence of a CaMKII inhibitor, the KN-93. We have demonstrated that production of NO is partly dependent on the activation of CaMKII by Ca<sup>2+</sup> pulsars. Finally, we

have established a hypertension model induced by chronic infusion of PE, which showed an alteration in the relationship between  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars and CaMKII. However, this particular model generates few ROS which is an important component involved in endothelial dysfunction associated with hypertension. In a second study, we established two chronic infused (normo- and hypertensive) AngII mice models to evaluate the impact of ROS and hypertension on  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars/CaMKII/NO signaling pathway. Our results showed an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars frequency along with a recruitment of CaMKII within MEPs. Acute AngII stimulation experiments supports data from the literature suggesting that ROS modulate  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics and that AngII stimulated NO production. This study proposes that these signaling pathways involve AngII  $\text{AT}_1$  and  $\text{AT}_2$  receptors.

$\text{Ca}^{2+}$  pulsars study strongly depends on the native structure of the artery maintaining MEPs. Evidence shows that MEPs appear to vary between vascular beds, species and pathophysiological conditions. The latest study presented in this thesis has established a relationship between MEPs and  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars in three distinct vascular beds (mesenteric, pulmonary and coronary arteries). Our results first showed that  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars kinetic parameters are highly conserved among different vascular beds. However,  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars frequency and number of active sites differ with a greater proportion in mesenteric and coronary arteries compared to pulmonary arteries. These results correlate with the highest number of MEPs found in mesenteric and coronary arteries. This study suggests that MEPs are essential to  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars, which are fundamental for resistance arteries.

Studies of this thesis led to the identification of a novel signaling pathway involving  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars and endothelial CaMKII in stimulating NO production. This new signaling pathway may be involved in the regulation of vascular tone in pathophysiological conditions. Moreover,  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars appear to be highly conserved among different resistance arteries despite the disparity in MEPs suggesting a key role in vascular function. This work opens an avenue for development of potential therapeutic targets that can counter endothelial dysfunction associated with arterial hypertension.

**Keywords:** local calcium signaling,  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars, myoendothelial projections, CaMKII, nitric oxide, reactive oxygen species, vascular endothelium, angiotensin II, arterial hypertension.

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract .....	iii
Table des matières .....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Abréviations .....	xi
Remerciements .....	xviii
 INTRODUCTION .....	 1
Chapitre 1 – L’endothélium vasculaire.....	3
1.1 Historique de l’endothélium .....	3
1.2 Structure des vaisseaux sanguins .....	4
1.2.1 Les cellules endothéliales vasculaires.....	5
1.2.2 La lame élastique interne .....	5
1.2.3 Les cellules musculaires lisses vasculaires .....	5
1.2.4 Les projections myoendothéliales .....	7
1.3 Régulation du tonus vasculaire par l’endothélium .....	10
1.3.1 Vasodilatation dépendante de l’endothélium.....	12
L’oxyde nitrique .....	12
La prostacycline.....	14
Le facteur hyperpolarisant dérivé de l’endothélium .....	15
1.3.2 Vasoconstriction dépendante de l’endothélium .....	20
La thromboxane A <sub>2</sub> .....	21
L’endothéline-1.....	21
Les espèces réactives à l’oxygène.....	22
L’angiotensine II.....	23
Chapitre 2 - L’homéostasie calcique endothéliale.....	25
2.1 Les médiateurs endothéliaux dépendants du Ca <sup>2+</sup> .....	25
2.1.1 L’oxyde nitrique.....	27
2.1.2 La prostacycline, la thromboxane A <sub>2</sub> et les acides époxyeicosatriénoïques.....	30

2.1.3 Facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium .....	30
<b>2.2 Les mécanismes responsables de l'homéostasie calcique endothéliale.....</b>	<b>31</b>
2.2.1 Les mécanismes responsables de l'augmentation du $\text{Ca}^{2+}$ libre intracellulaire .....	32
Les récepteurs à l' $\text{IP}_3$ .....	33
Les canaux à potentiel de récepteur transitoire (TRPs) .....	36
Le complexe ORAI1/STIM1 .....	37
2.2.2 Les mécanismes d'évacuation du $\text{Ca}^{2+}$ libre intracellulaire .....	38
Les pompes ATPase du réticulum endoplasmique (SERCA).....	38
Les pompes ATPase de la membrane plasmique (PMCA).....	40
Les échangeurs sodium/calcium (NCX) .....	41
2.2.3 La mitochondrie .....	41
<b>2.3 Les dynamiques calciques endothéliales .....</b>	<b>43</b>
2.3.1 La signalisation calcique globale .....	44
2.3.2 La signalisation calcique locale .....	46
Les « $\text{Ca}^{2+}$ blips » et « $\text{Ca}^{2+}$ puffs » .....	48
Les pulsars calciques .....	49
Les « $\text{Ca}^{2+}$ wavelets » .....	51
Les « $\text{Ca}^{2+}$ sparklets » .....	52
<b>Chapitre 3 – CaMKII vasculaire.....</b>	<b>56</b>
<b>3.1 La structure et les isoformes de CaMKII .....</b>	<b>57</b>
<b>3.2 Mécanismes d'activation de CaMKII .....</b>	<b>59</b>
<b>3.3 Les cibles et fonctions de CaMKII .....</b>	<b>63</b>
<b>3.4 CaMKII vasculaire .....</b>	<b>66</b>
3.4.1 CaMKII dans les cellules musculaires lisses vasculaires.....	66
3.4.2 CaMKII dans les cellules endothéliales .....	69
<b>3.5 CaMKII et les pathologies vasculaires .....</b>	<b>73</b>
<b>Chapitre 4 – La dysfonction endothéliale .....</b>	<b>76</b>
<b>4.1 Le stress oxydant vasculaire .....</b>	<b>77</b>
4.1.1 Les sources endothéliales d'espèces réactives à l'oxygène .....	79
L'oxyde nitrique synthase endothéliale découplée .....	79
La NADPH oxydase .....	80
4.1.2 Les dommages vasculaires du stress oxydant .....	81



Diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium.....	82
Stimulation de la vasoconstriction.....	84
Altération de l'homéostasie calcique endothéliale.....	86
<b>4.2 La dyshoméostasie calcique endothéliale.....</b>	<b>90</b>
<b>Chapitre 5 – L'hypertension artérielle .....</b>	<b>94</b>
<b>5.1 Le système rénine angiotensine (RAS).....</b>	<b>95</b>
5.1.1 Les récepteurs à l'angiotensine II .....	97
Les récepteurs AT <sub>1</sub> .....	98
Les récepteurs AT <sub>2</sub> .....	99
<b>5.2 Les traitements contre l'hypertension artérielle.....</b>	<b>101</b>
<b>Chapitre 6 – Mise en contexte de la thèse .....</b>	<b>103</b>
<b>6.1 Hypothèses de la thèse .....</b>	<b>105</b>
<b>6.2 Objectifs de la thèse .....</b>	<b>105</b>
<b>6.3 Publications .....</b>	<b>106</b>
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>108</b>
<b>Article 1.....</b>	<b>110</b>
Apport original et contribution des coauteurs .....	110
Mise en contexte de l'article 1.....	112
Hypothèses et objectifs de l'article 1 .....	113
Manuscrit.....	114
<b>Article 2.....</b>	<b>160</b>
Apport original et contribution des coauteurs .....	160
Mise en contexte de l'article 2.....	162
Hypothèses et objectifs de l'article 2 .....	162
Manuscrit.....	164
<b>Article 3.....</b>	<b>195</b>
Apport original et contribution des coauteurs .....	195
Mise en contexte de l'article 3.....	197
Hypothèses et objectifs de l'article 3 .....	198
Manuscrit.....	199

<b>DISCUSSION .....</b>	<b>220</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>221</b>
<b>Expression et localisation de CaMKII dans l'endothélium vasculaire .....</b>	<b>222</b>
<b>Fonction physiologique des pulsars calciques .....</b>	<b>225</b>
<b>Stimulation des pulsars calciques en hypertension .....</b>	<b>227</b>
<b>Modulation des pulsars calciques par les espèces réactives à l'oxygène .....</b>	<b>230</b>
<b>Implication des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> dans la stimulation des pulsars calciques .....</b>	<b>233</b>
<b>Impact de l'hypertension sur la voie de NO/CaMKII dépendante des pulsars calciques .....</b>	<b>235</b>
<b>Caractérisation des pulsars calciques dans différents lits vasculaires .....</b>	<b>237</b>
<b>Limitations .....</b>	<b>239</b>
 <b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	 <b>242</b>
<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>243</b>
<b>Références .....</b>	<b>247</b>

## Liste des tableaux

Tableau I. Caractéristiques des différentes signalisations calciques locales. ....	47
--	----

## Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique de la paroi vasculaire.....	4
Figure 2. Représentation des projections myoendothéliales.....	9
Figure 3. Facteurs vasodilatateurs générés par l'endothélium.....	11
Figure 4. Les multiples effets du NO endothélial sur l'homéostasie vasculaire.....	14
Figure 5. Voies de signalisations de la biosynthèse des prostanoïdes.....	15
Figure 6. Les voies de signalisations impliquées dans le l'EDHF.....	19
Figure 7. Facteurs vasoconstricteurs générés par l'endothélium.....	20
Figure 8. Les Médiateurs endothéliaux dépendants du $Ca^{2+}$ .....	26
Figure 9. Mécanisme d'activation de la NOS3.....	27
Figure 10. Régulation de l'activité de la NOS3 par le $Ca^{2+}$ et la phosphorylation.....	29
Figure 11. Voies de signalisations impliquées dans l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ .....	33
Figure 12. Voies de signalisations impliquées dans l'évacuation du $Ca^{2+}$ intracellulaire.....	39
Figure 13. Signalisation calcique globale de l'endothélium vasculaire.....	45
Figure 14. Les " $Ca^{2+}$ blips" et les " $Ca^{2+}$ puffs" de l'endothélium vasculaire.....	49
Figure 15. Les pulsars calciques de l'endothélium vasculaire.....	51
Figure 16. Les $Ca^{2+}$ wavelets de l'endothélium vasculaire.....	52
Figure 17. Les $Ca^{2+}$ sparklets de l'endothélium vasculaire.....	55
Figure 18. Structure et activation de CaMKII.....	59
Figure 19. Activité de CaMKII: décodeur d'oscillations calciques.....	61
Figure 20. L'endothélium en physiopathologie.....	77
Figure 21. Schéma des voies de signalisation des pulsars calciques.....	246

## Abréviations

5-MTHF	5-méthyltétrahydrofolate, antioxydant
20-HETE	acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque
$\alpha$ KAP	protéine d'ancrage de la kinase $\alpha$
A23187	ionophore calcique
ADMA	diméthyle-arginine asymétrique, analogue inhibiteur de la L-arginine
ADP	adénosine diphosphate
AC	adénylate cyclase
ACE	enzyme de conversion de l'angiotensine
Ach	acétylcholine
AKAP150	la protéine d'ancrage de la kinase A
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
AngII	angiotensine II
AngII-AH	modèle d'hypertension artérielle induite par une infusion chronique d'AngII
AngII-NT	modèle normotendu d'infusion chronique à faible dose d'AngII
ApoE <sup>-/-</sup>	souris n'exprimant plus l'apolipoprotéine E
ARBs	bloqueurs des récepteurs à l'angiotensine II
AT <sub>1</sub>	récepteur de type 1 à l'AngII
AT <sub>2</sub>	récepteur de type 2 à l'AngII
AT <sub>2</sub> <sup>-/-</sup>	souris n'exprimant plus les récepteurs AT <sub>2</sub>
ATP	adénosine triphosphate
AVCs	accidents vasculaires cérébraux
B <sub>2</sub>	récepteurs à la bradykinine
BAEC	cellules endothéliales d'aorte bovine

BCEC4	lignée 4 de cellules endothéliales immortalisées de capillaires cérébrales
BH <sub>4</sub>	tétrahydrobioptérine
Bk	bradykinine
BK <sub>Ca</sub>	canaux potassiques de grande conductance dépendants du Ca <sup>2+</sup>
BPAEC	cellules endothéliales isolées d'artères pulmonaires bovines
Ca <sup>2+</sup>	calcium
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Ca <sup>2+</sup> libre intracellulaire
CaMKII	kinase II dépendante du complexe Ca <sup>2+</sup> /calmoduline
CaMKIIN	modèle expérimental exprimant le peptide inhibiteur de CaMKII
Ca <sub>v</sub> 1.2	canaux calciques activés par le voltage
Cavβ3	sous-unité régulatrice β3 du canal calcique voltage-dépendant
CEs	cellules endothéliales
CICR	<i>Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release</i>
CMLVs	cellules musculaires lisses vasculaires
CNP	peptide natriurétique de type C
CO	monoxyde de carbone
COX	cyclooxygénase
CPA	acide cyclopiazonique
cPLA <sub>2</sub>	phospholipase A2 cytoplasmique
Cx	connexines
Cx40 <sup>-/-</sup>	souris n'exprimant plus la Cx40
CYP450	cytochrome P450
DAF-FM	4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacétate
DAG	diacylglycérol
DHE	dihydroéthidium

EDHF	facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium
EETs	acides époxyeicosatriénoïques
EF	<i>EF-hand motif</i>
ENAP-1	protéine d'association à la NOS3 ( <i>Endothelial NOS-associated Protein-1</i> )
ET-1	endotheline-1
ET <sub>A</sub> et ET <sub>B</sub>	récepteurs à l'ET-1
FAD	flavine adénine dinucléotide
FMN	flavine mononucléotide
G <sub>i</sub>	protéine G inhibitrice
G <sub>s</sub>	protéine G stimulatrice
GCs	guanylate cyclase soluble
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
GPCRs	récepteurs couplés aux protéines G
GSK	GSK1016790A, agoniste sélectif des canaux TRPV4
HCX	échangeurs H <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
HDAC4	histone désacétylase 4
HDMEC	cellules endothéliales humaines de micro-vaisseaux du derme
HNO	nitroxyle
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxyde d'hydrogène
HSP90	protéine de choc thermique 90 ( <i>Heat Shock Protein-90</i> )
HUVEC	cellules endothéliales humaines de la veine de cordon ombilical
ICAM-1	molécules d'adhésion intercellulaire
IEL	lame élastique interne
IK <sub>Ca</sub>	canaux potassiques Ca <sup>2+</sup> -dépendant de moyenne conductance
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5-trisphosphate

K <sup>+</sup>	potassium
K <sub>ATP</sub>	canaux potassiques sensibles à l'ATP
K <sub>Ca2.3</sub>	canaux potassiques Ca <sup>2+</sup> -dépendant de faible conductance
K <sub>Ca3.1</sub>	canaux potassiques Ca <sup>2+</sup> -dépendant de moyenne conductance
K <sub>ir</sub>	canaux potassiques à rectification entrante ( <i>inwardly rectifying</i> )
K <sub>v</sub>	canaux potassiques voltage-dépendants
KCl	chlorure de potassium
KN-93	2-[N-(2-hydroxyethyl)]-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)] amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine), inhibiteur sélectif à CaMKII
L-NMMA	N(G)-monométhyle-L-arginine, analogue inhibiteur de la L-arginine
mCU	uniporteurs calciques; <i>mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter</i>
Mg <sup>2+</sup>	Magnésium
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MLCK	kinase des chaînes légères de la myosine
MLCP	phosphatase des chaînes légères de la myosine
MLC20	chaîne légère de la myosine
MMP9	métalloprotéinase 9
mNCX	échangeurs Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> mitochondriaux
mPTP	pores de transitions de perméabilité mitochondriale
MsrA	méthionine sulfoxyde réductase
NAC	N-acétyl cystéine
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
Na <sub>v</sub> 1.5	canaux sodique voltage-dépendant
NE	norépinephrine
NCX	échangeurs Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>



NO	oxyde nitrique
NOS1	oxyde nitrique synthase neuronale
NOS2	oxyde nitrique synthase inductible
NOS3	oxyde nitrique synthase endothéliale
NOS3 <sup>-/-</sup>	souris n'exprimant plus la NOS3
O <sub>2</sub>	oxygène
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	anion superoxyde
OH <sup>·</sup>	radical hydroxyle
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONOO <sup>-</sup>	peroxynitrite
ORAI1	<i>Calcium release-activated calcium channel protein 1</i>
ox-CaMKII	CaMKII oxydée en Met281/282
p47 <sup>phox</sup> <sup>-/-</sup>	souris n'exprimant plus la sous-unité p47 <sup>phox</sup> de la NADPH oxydase
PAF	facteur d'activation des plaquettes
PE	phényléphrine
PGI <sub>2</sub>	prostacycline
PIP <sub>2</sub>	phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PKG	protéine kinase G
PLA	<i>proximity ligation assay</i>
PLA <sub>2</sub>	phospholipase A2
PLB	phospholamban
PLC	phospholipase C
PLT	potentialisation à long terme

PMCA	pompes $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de la membrane plasmique
PMEs	projections myoendothéliales
PP1 $\alpha$	protéine phosphatase 1 $\alpha$
PP2A	protéine phosphatase 2A
PYK2	protéine tyrosine kinase 2
RAS	système rénine angiotensine
RE	réticulum endoplasmique
ROC	<i>Receptor-operated channel</i>
ROCE	<i>Receptor-operated <math>\text{Ca}^{2+}</math> entry</i>
ROS	espèces réactives à l'oxygène
RyRs	récepteurs à la ryanodine
SERCA	pompes $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du réticulum sarco/endoplasmique
SHR	modèle de rats spontanément hypertendus
SK <sub>Ca</sub>	canaux potassiques $\text{Ca}^{2+}$ -dépendant de faible conductance
SNP	nitroprussiate de sodium
SOCE	<i>Store-Operated <math>\text{Ca}^{2+}</math> Entry</i>
SOD	superoxyde dismutase
sPLA <sub>2</sub>	phospholipase A2 sécrétoire
SR	réticulum sarcoplasmique
STIM1	<i>Stromal Interaction Molecule 1</i>
TKRs	récepteurs à tyrosine kinase
TP	récepteurs de la TXA <sub>2</sub>
tPA	activateur tissulaire du plasminogène
TRPs	canaux à potentiel de récepteur transitoire
TRPC4 <sup>-/-</sup>	souris n'exprimant plus TRPC4

TRPV4	TRPs de la famille des vanilloïdes 4
TRPV4 <sup>-/-</sup>	souris n'exprimant plus TRPV4
TXA <sub>2</sub>	thromboxane A2
VCAM-1	molécules d'adhésion des cellules vasculaires
VDAC	canaux anioniques voltage-dépendants
VDCC	canaux calciques voltage-dépendants
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
vWF	facteur de von Willebrand
WKY	modèle contrôle de rats Wistar Kyoto
ZnS <sub>4</sub>	zinc-thiolate

## Remerciements

**Aux membres du Jury, Dr Éric Thorin, Dr Jean-Philippe Gratton et Dr Normand Leblanc,**

Jusqu'à présent j'ai rarement vu qu'un chercheur avait du temps libre devant lui, d'abord pour cela, je vous remercie d'avoir accepté de prendre du peu de temps que vous disposez à lire et évaluer ma thèse. Votre expertise assurera une excellente critique de ma thèse, ce qui me permettra de grandement l'améliorer.

**À mon directeur de recherche et mentor, Dr Jonathan Ledoux,**

Je tiens à t'exprimer toute ma gratitude pour ces belles années que j'ai eu la chance de partager avec toi, en tant que directeur, mais aujourd'hui je pense avoir également le droit de dire en tant qu'ami. Jonathan, ton dynamisme, ta passion, ta détermination, ton perfectionnisme, ton intelligence et ta curiosité sont une source incroyable de motivation, qui m'a permis de franchir plusieurs étapes depuis mon entrée dans ton laboratoire. Grâce à toi, je me suis vue grandir dans mon domaine professionnel et acquérir des aptitudes d'un vrai chercheur. D'ailleurs, quoi dire du sens critique, je peux t'assurer qu'aujourd'hui mon sens critique est si développé que j'arriverai même à critiquer le dictionnaire. Depuis mon arrivée au laboratoire, tu m'as énormément gâté de ton temps, de ton attention, de tes conseils et de tes nombreux encouragements, pour cela je tiens sincèrement à te remercier. Tu as également été pour moi un excellent confident. En effet, tu as toujours pris le temps de répondre attentivement à mes nombreux courriels de panique et toujours eu les bons mots pour éteindre le feu. Je ne peux passer à côté des nombreux voyages que tu m'as permis de faire, qui m'ont non seulement donné la chance de gagner des prix à l'international, mais également fait découvrir une facette extraordinaire de la science. Enfin, en tant que première étudiante, je t'assure que j'ai été comblé dans ton laboratoire et j'en suis ressortie énormément enrichie.

**À mes collègues et amis de laboratoire,**

**À Alexandre Blanchette,**

Mon cher Al, en tant que biochimiste qui a la capacité de tamponner des solutions ou plutôt des situations, tu es le meilleur. Je ne peux dire autrement sur ton assiduité en recherche, qui m'a permis entre autre de faire des courbes parfaites de qPCR. Merci pour ta patience et ton écoute. Ces dernières années en ta compagnie m'ont appris à gérer mon stress et aussi d'en ressortir plus mature.

**À Fanny Toussaint,**

Ma petit Fanny d'amour, je suis si heureuse de t'avoir eu à mes côtés durant toutes ces années, une excellente collègue, mais aussi une merveilleuse amie. Tu as toujours été présente pour moi, prête à m'aider sans aucune hésitation, tu es probablement la fille la plus gentille et serviable que je connaisse. Je te remercie pour tout le temps que tu m'as accordé, mais aussi pour ta bonne science. Sachant que je suis perfectionniste jusqu'à dire extrémiste, tu as toujours accepté de m'aider. Fanny tu es une excellente chercheuse, avec ton sens critique et tes nombreuses questions, tu m'as toujours poussé à chercher plus loin. J'ai eu un énorme plaisir de travailler avec toi. Merci pour tout.

**À Delphine Béziau,**

Del, ma française préférée, tu n'es venu que vers la fin de mon doctorat et si vite tu as su prendre une grande place dans ma vie. Je te remercie pour ta participation dévoué dans mes travaux. Qui aurait cru, arriver à faire fonctionner des shRNA en 6 mois! Plusieurs ont remis la faisabilité du projet en question, mais tu as su nous démontrer que tu es une championne. Merci pour ton aide précieux.

**À Nour Daya,**

Nawer, j'ai eu un plaisir de travailler avec toi, même si ce fut très court. Une chose est certaine c'est qu'on ne peut s'ennuyer en ta présence. Je tiens à te remercier pour tout le travail que tu as complété pour la rédaction de notre merveilleux article.

**Aux personnels de l'Institut de Cardiologie de Montréal,**

Merci à tous le personnel de l'Institut de Cardiologie de Montréal qui m'a aidé à accomplir mes travaux de recherche.

**À Maya Mamarbachi,**

Tu as été un mentor de la biologie moléculaire. Merci pour ta patience, ton expérience et ton savoir. Nous gagnons tous à te connaître, tu es une ressource inestimable.

**À Louis Villeneuve,**

Je te remercie d'avoir su vulgariser les notions de la microscopie confocale, cela m'a permis de surmonter mes phobies de la physique optique. Merci pour les moments où tu m'as permis de décompresser dans ta chambre noire. Grâce à cela, je suis devenue une championne du démineur.

**À Marc-Antoine Gillis,**

Marcus, merci pour ton temps et la flexibilité de ton horaire que tu as si souvent fait preuve en travaillant avec moi. Merci pour les bons moments passés ensemble dans ton laboratoire et surtout merci de m'avoir fait découvrir un de mes sports favoris, le bateau dragon. Que des bons moments passés à pagayer avec toi.

**À ma famille et mes amis,**

À Isma,

Chère Ismou merci d'avoir montré tellement d'intérêt face à mes travaux et surtout à mon cheminement. Tu as été là dans les bons moments comme dans les pires pour savoir m'encourager de la meilleure façon. Merci d'être une amie si fidèle.

À Sophia,

Ma meilleure amie, je te remercie d'avoir cru en moi depuis le secondaire 1. Ton positivisme et ta confiance m'ont permis de passer facilement à travers les moments les plus difficiles

mais également de profiter pleinement de tous les merveilleux moments. Merci de m'avoir suivi et supporté durant tout mon parcours académique.

À ma soeur,

Voilà chère soeur, merci d'avoir cru en moi pour me laisser la job du cerveau de la famille.

À ma maman,

Très chère maman, je te remercie pour m'avoir préparé les meilleurs repas du monde pour t'assurer que je mange bien durant toute cette aventure.

À mon papa,

Tu m'as guidé durant toutes mes études pour m'inculquer les meilleures valeurs, dont la persévérance. Je te remercie d'avoir mis autant de temps sur moi ainsi que d'avoir toujours cru en moi, car aujourd'hui je me suis rendue là grâce à toi.

À Patrick,

Mon amoureux, tu as été présent auprès de moi durant tous les moments mémorables de mon PhD : les congrès, les nuits blanches, le pré-doc, les papiers, la thèse et évidemment nos deux beaux enfants avec tout ça. Tu m'as toujours supporté comme le meilleur fan qu'une vedette pourrait avoir. Merci d'avoir cru en moi et surtout pour toute la fierté que tu as pour moi. Je sais très bien que par moments c'était difficile, je te remercie infiniment de ta patience, de ta compréhension, de ta générosité, de ton enthousiasme et de ta gentillesse. Aujourd'hui, tout ton investissement sur moi va porter fruit, c'est à mon tour d'être à tes côtés. J'ai hâte de commencer notre nouvelle vie avec nos enfants.

*Only one who devotes himself to a cause with his whole strength and soul can be a true master. For this reason mastery demands all of a person.*

**— *Albert Einstein***



# **INTRODUCTION**

## Introduction

L'hypertension artérielle est un important facteur de risque cardiovasculaire qui affecte 20% de la population canadienne. De nombreuses altérations pathologiques liées à l'hypertension sont associées à une perturbation des mécanismes physiologiques maintenant l'intégrité vasculaire. L'endothélium contribue grandement à la fonction vasculaire par sa capacité à finement moduler la perméabilité vasculaire, l'angiogenèse, ainsi que le tonus vasculaire *via* la synthèse ou la sécrétion d'agents vasoactifs. Ces différentes fonctions endothéliales requièrent le  $\text{Ca}^{2+}$  à plusieurs niveaux, d'où l'importance d'approfondir nos connaissances sur les différentes dynamiques calciques endothéliales et leurs cibles potentielles.

Cette thèse met en évidence l'importance des dynamiques calciques locales endothéliales en suggérant une nouvelle voie de signalisation impliquant CaMKII et la NOS3 en condition physiologique, ainsi que dans deux modèles d'hypertension artérielle. L'introduction permettra de faire une revue de la littérature des principaux sujets menant à l'élaboration des hypothèses et objectifs de mon projet de recherche. Les principaux sujets de l'introduction porteront sur le rôle de l'endothélium dans la régulation du tonus vasculaire, plus précisément les mécanismes régulateurs importants pour cette fonction, les dynamiques calciques endothéliales ainsi que les différentes composantes de la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension artérielle.

## **Chapitre 1 – L’endothélium vasculaire**

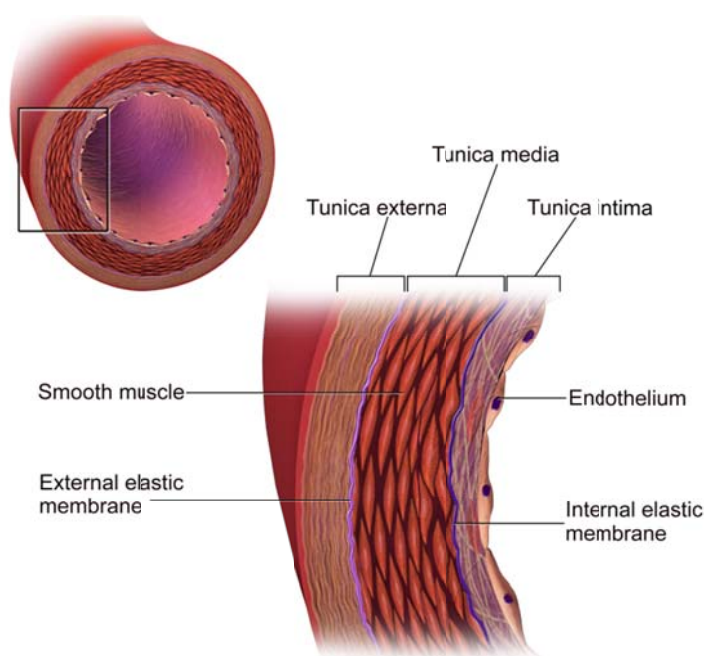
L’endothélium vasculaire est un sujet qui prend une ampleur importante dans la communauté scientifique depuis quelques décennies. En effet, de nombreuses études ont permis de mettre en lumière les notions concernant l’endothélium et ses multiples propriétés tant au niveau physiologique qu’en conditions pathologiques. L’endothélium est affecté par les facteurs de risque cardiovasculaire ce qui l’implique dans l’initiation et la progression des pathologies cardiovasculaires. Afin de maintenir l’homéostasie vasculaire, l’endothélium module finement diverses fonctions telles que le tonus vasculaire, la perméabilité vasculaire, ainsi que le processus d’inflammation [1, 2].

### **1.1 Historique de l’endothélium**

Les CEs en contact direct avec le sang étaient autrefois considérées comme une simple barrière physique passive. En 1966, Lord Adrian Florey et son équipe ont rédigé un article scientifique récoltant les diverses observations faites par microscopie électronique sur les CEs pour ensuite y ajouter une composante importante à la définition des CEs, soit un organe dynamique composé de vésicules tels les cavéolae [3]. Ces vésicules, contrôlant le passage de certaines molécules de la lumière des vaisseaux aux CMLVs avoisinantes, démontrent que les CEs sont un système de transport actif. Toutefois, l’attribution d’une nouvelle fonction à l’endothélium, suite aux impressionnantes découvertes de Furchgott en 1980 se méritant le prix Nobel de Médecine en 1998 en collaboration avec Ignarro et Murad, a révolutionné le monde scientifique [4]. Ces études ont permis de démontrer le rôle prépondérant de l’endothélium dans le contrôle du tonus vasculaire par la libération d’une substance aujourd’hui connue sous le nom de NO, causant la relaxation des CMLVs sous-jacentes [5]. Depuis, outre la perméabilité et la régulation du tonus vasculaire, plusieurs autres fonctions physiologiques ont été attribuées à l’endothélium démontrant ainsi son implication importante dans des processus tels que l’angiogenèse et la réponse inflammatoire.

## 1.2 Structure des vaisseaux sanguins

La paroi vasculaire est constituée de trois tuniques (intima, média et adventice) composées principalement par l'endothélium et le muscle lisse séparés d'une lame élastique interne (IEL), ainsi que par une couche périphérique de tissu conjonctif (Figure 1, page 4) [6]. La structure et l'importance de ces différentes couches varient selon le type vasculaire (artères, veines, capillaires, etc.), mais également selon leurs positions dans le lit vasculaire (calibre). Le système artériel est généralement divisé selon leurs propriétés mécaniques en deux catégories, soit les artères de conductance (gros calibres, élastiques) et les artères de résistance (moyens et petits calibres, musculaires). D'une part, les artères de conductance comme l'aorte permettent le maintien d'un flux sanguin continu en amortissant l'impact provoqué par la pression systolique. D'autre part, les artères de résistance telles que les artères mésentériques (3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> ordre) ont la capacité de moduler leur diamètre afin de contrôler le débit sanguin et la pression artérielle. Dans l'intérêt de cette thèse, nous discuterons principalement de la structure et de la fonction des artères de résistance.



**Figure 1. Représentation schématique de la paroi vasculaire.**

Endothélium, membrane élastique externe, membrane élastique interne, muscle lisse, tunique externe, tunique interne et tunique media. (D'après Blausen.com staff. "Blausen gallery 2014". Wikiversity Journal of Medicine 1 (2).)

### **1.2.1 Les cellules endothéliales vasculaires**

L'endothélium formant l'intima est composé d'une monocouche de CEs qui tapisse la paroi interne des vaisseaux sanguins et lymphatiques de tout le système circulatoire. Au niveau des vaisseaux sanguins les CEs assurent l'échange de diverses substances entre le sang et la paroi vasculaire. La disposition longitudinale des CEs selon la direction du flux sanguin permet de diminuer l'impact des contraintes de cisaillements provoquées par le débit sanguin. La présence de jonctions intercellulaires est importante pour la perméabilité vasculaire (pour une revue de la littérature [7, 8]). Les CEs synthétisent la IEL sur laquelle elles sont fixées et de nombreuses enzymes importantes dans le remodelage vasculaire et l'angiogenèse [9]. Enfin, outre la perméabilité vasculaire, les CEs régulent l'angiogenèse, la prolifération et la migration cellulaire, l'adhésion et l'agrégation plaquettaire ainsi que la vasomotricité artérielle. Ces mécanismes régulateurs sont impliqués dans de nombreux processus tels que l'inflammation, la thromolyse et la fibrinolyse *via* la synthèse et la libération de divers facteurs [1, 10, 11].

### **1.2.2 La lame élastique interne**

La IEL sépare l'endothélium du muscle lisse. Elle fait partie de la couche média des vaisseaux sanguins et est constituée d'élastine autofluorescente dotée de fenestrations. Généralement, l'épaisseur de la IEL est proportionnelle au calibre du vaisseau et varie selon le lit vasculaire, alors que la taille et la densité de ses fenestrations sont inversement proportionnelles au calibre du vaisseau [12-19]. Les caractéristiques des fenestrations de la IEL varient selon la fonction vasculaire en condition physiopathologique. En effet, il a été montré que les contraintes de cisaillements et le débit sanguin engendrent une augmentation de la fenestration de la IEL [15, 18, 20]. Des méthodes d'analyses automatiques sur des images en microscopie ont permis de caractériser les trous de la IEL selon leur nombre, leur taille et leur surface [12, 16]. Le rôle primordial de ces fenestrations est de permettre la diffusion de substances vasoactives et ainsi une communication intercellulaire afin de moduler la fonction vasculaire [12, 17, 18].

### **1.2.3 Les cellules musculaires lisses vasculaires**

La couche média des vaisseaux sanguins est formée principalement de CMLVs disposées perpendiculairement aux CEs. Le rôle primordial de ces cellules est de contrôler la résistance

vasculaire par le maintien du tonus myogénique. Ce mécanisme est une propriété intrinsèque des CMLVs qui permet d'ajuster le diamètre des artères de façon locale en réponse aux changements de pression intraluminale afin de réguler l'apport sanguin. Le tonus myogénique implique donc la contraction du muscle lisse vasculaire indépendamment du système nerveux [21]. L'impact du tonus myogénique est d'autant plus important que le calibre du vaisseau diminue, comme par exemple dans les artères de résistances [21-23].

### **Tonus myogénique**

En premier lieu, la pression intraluminale cause un étirement du vaisseau qui engendre des changements au niveau du cytosquelette activant divers canaux membranaires tels que les canaux à potentiel de récepteur transitoire (TRPs) activés par l'étirement et les canaux sodiques. Ces mécanismes vont conduire à une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  essentielle pour la contraction. Suite à l'activation de canaux cationiques non-sélectifs, la membrane des CMLVs se dépolarise ce qui engendre l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants (VDCC) et par conséquent, un influx calcique [24, 25]. Cet influx calcique provoque une libération de  $Ca^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique (SR) vers le cytosol *via* les récepteurs à la ryanodine (RyRs), générant ainsi des vagues calciques ou des  $Ca^{2+}$  *sparks* impliqués dans le mécanisme de contraction [24]. Toutefois, ces dynamiques calciques sont également impliquées dans un mécanisme de rétroaction négatif menant à l'activation des canaux potassiques de grande conductance dépendants du  $Ca^{2+}$  ( $BK_{Ca}$ ) pouvant hyperpolariser la membrane des CMLVs [25, 26]. Il est intéressant de noter qu'au niveau vasculaire, les RyRs, ainsi que les VDCC sont spécifiques aux CMLVs et ne sont donc pas exprimés dans les CEs.

L'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  est primordial pour l'appareil contractile. Le  $Ca^{2+}$  va se lier à la calmoduline pour former le complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline nécessaire pour l'activation de la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK). Une fois activée, la MLCK va phosphoryler la chaîne légère de la myosine (MLC20) qui déclenche l'activité enzymatique ATPase de la myosine. Ainsi, la MLC20 phosphorylée provoque un changement de conformation de la myosine qui se manifeste par un glissement entre les filaments d'actine et de myosine. Ce mécanisme est en concurrence avec la phosphatase des chaînes légères de la

myosine (MLCP) qui déphosphoryle la MLC20 afin de provoquer une rupture de la liaison entre l'actine et la myosine.

#### **1.2.4 Les projections myoendothéliales**

De nombreuses études ont révélé par microscopie électronique la présence de projections des CEs vers le muscle lisse traversant les fenestrations de la IEL (Figure 2, page 9) [12, 27-31]. Ces PME sont un lieu de contact avec les CMLVs sous-jacentes. Les PME forment des sites privilégiés de communications importants pour des mécanismes tels que l'EDHF. L'EDHF qui est un amalgame de mécanismes pouvant hyperpolariser les CMLVs possède des composantes spécifiques localisées dans les PME (détaillé dans la section 1.3.1). Ainsi, une relation fonctionnelle importante s'est établie entre les PME et l'EDHF. En effet, ces PME semblent être absentes de l'artère fémorale de rat où une relaxation dépendante de l'EDHF n'est pas apparente [32]. Malgré les disparités structurelles et fonctionnelles, ces projections ont été observées dans divers espèces et lits vasculaires, que ce soit des artères de résistance ou de conductance [12, 27-29]. Similairement aux fenestrations de la IEL, le nombre de PME augmente proportionnellement à la diminution du diamètre du vaisseau. D'ailleurs, cette observation concorde avec l'importance de l'EDHF qui augmente plus le calibre du vaisseau est petit [12, 14, 31]. De plus, le nombre et la taille des PME peuvent également varier selon la condition physiopathologique [12, 27]. Dans l'artère caudale d'un modèle de rats spontanément hypertendus (SHR), le nombre de PME est significativement plus élevé que dans le modèle contrôle de rats Wistar Kyoto (WKY) [27]. Sadow et coll. ont donc suggéré que l'impact fonctionnel d'un tel remodelage impliquerait un rôle des PME dans la régulation de l'EDHF pouvant opposer l'effet d'une prolifération des CMLVs en hypertension. Néanmoins, la structure de la IEL, les caractéristiques des PME (nombre, taille, etc.), ainsi que les voies de signalisations présentes dans ces microenvironnements ne sont pas encore clairement établies selon le type vasculaire.

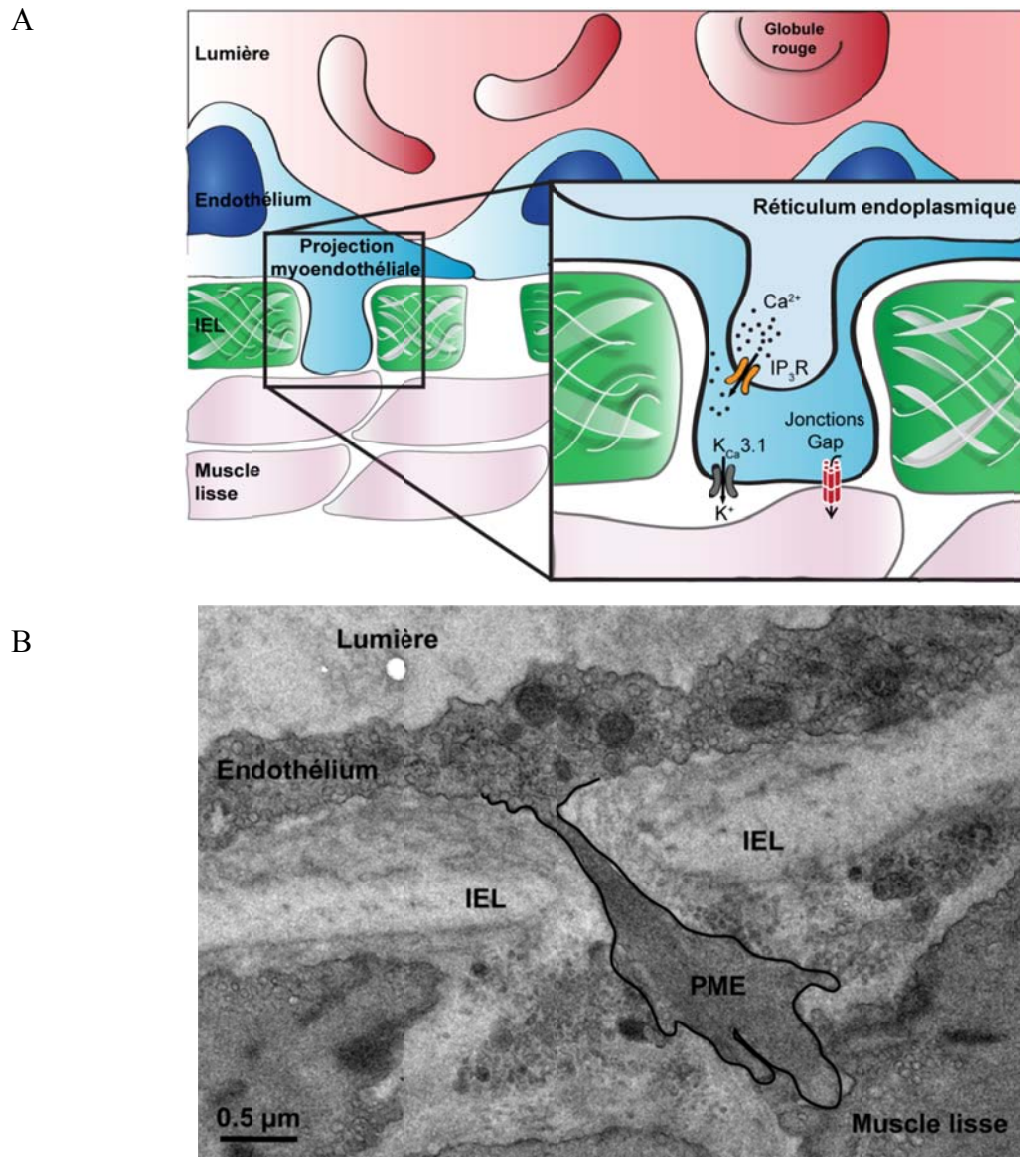
Les microdomaines que forment les PME ont suscité un grand intérêt de recherche scientifique puisqu'une corrélation importante a été établie entre ces projections et la fonction vasculaire, particulièrement pour le mécanisme de l'EDHF ([33] revue de la littérature). Les PME permettent une communication intime entre les CEs et les CMLVs par la présence de

jonctions communicantes de type Gap facilitant l'échange d'importants seconds messagers tels que l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) et le Ca<sup>2+</sup> [34-37]. En effet, ces jonctions privilégient une interaction bidirectionnelle entre les deux types cellulaires ce qui favorise le processus de rétroaction myoendothéliale ainsi que le passage d'agents pouvant moduler la dilatation et la constriction artérielle. Brièvement, une stimulation des CMLVs par un agoniste tel que la PE provoque une contraction cellulaire accompagnée d'une augmentation d'IP<sub>3</sub> et de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> dans les CEs [38]. Cette augmentation de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> engendre l'activation de divers mécanismes vasodilatateurs dépendants du Ca<sup>2+</sup> tels que la production de NO par la NOS3 [38]. Par conséquent, la réponse endothéliale transmise à nouveau au muscle lisse semble atténuer la constriction initiée par l'agoniste [38, 39]. Ce concept nommé rétroaction myoendothéliale a été initialement suggéré par Dora et coll. suite aux travaux de Segal et coll. démontrant la communication importante entre les deux types cellulaires [40, 41]. Aujourd'hui de nombreuses études ont complété cette hypothèse en proposant différents mécanismes pouvant être impliqués dans ce processus [19, 29, 30, 38, 42]. Néanmoins, plusieurs aspects de cette réponse myoendothéliale restent équivoques, entre autres, la nature du second messager (Ca<sup>2+</sup> ou IP<sub>3</sub>) responsable de l'augmentation du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> dans les CEs, ainsi que les voies de signalisations impliquées dans la réponse cellulaire.

L'étude de ces microdomaines a mené à l'identification de nombreuses protéines circonscrites au niveau de la membrane plasmique des PMEs (revue de la littérature [43]). D'abord, la présence de jonctions Gap entre les CEs et les CMLVs a permis de détecter l'expression de connexines (Cx37, Cx40 et Cx43) au niveau des PMEs [44-46]. D'autre part, des études réalisées en microscopie confocale ont permis de montrer une localisation des récepteurs à l'IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>Rs) du réticulum endoplasmique (RE) des CEs au niveau des fenestrations de la IEL, soit dans les sites des PMEs [19, 47]. Récemment, deux études ont révélé la présence d'évènements calciques restreints causés par une libération de Ca<sup>2+</sup> provenant du RE dans les PMEs [19, 29]. Ces évènements calciques localisés seront détaillés dans le prochain chapitre (chapitre 2, page 25). Des expériences en immunofluorescence sur des artères mésentériques de souris ont permis d'observer également la présence de canaux potassiques K<sub>Ca</sub>3.1 [19, 46] et de canaux TRPs (TRPV4, TRPC3) [42, 48] à la membrane plasmique de ces PMEs, ainsi que celle de l'enzyme NOS3 [49]. Ces diverses protéines sont intimement associées à la



fonction endothéliale principalement par leur implication respective dans le mécanisme de l'EDHF et de la production de NO, entraînant ainsi une vasodilatation artérielle. Par conséquent, il est évident que l'endothélium et ses projections vers le muscle lisse sont essentiels à une fonction vasculaire adéquate.



**Figure 2. Représentation des projections myoendothéliales.**

A. Schématisation d'une projection myoendothéliale (PME) traversant la lamina élastique interne (IEL) avec un agrandissement de la PME montrant son microdomaine (modifiée d'après Toussaint et coll., 2015).  $K_{Ca}3.1$  : canaux potassiques dépendants du  $Ca^{2+}$  de moyenne conductance,  $IP_3R$  : récepteur à l'inositol 1,4,5-trisphosphate ( $IP_3$ ),  $K^+$  : potassium. B. Coupe transversale d'une artère mésentérique de souris montrant une PME par microscopie électronique à transmission (Image par Dre Delphine Béziau).

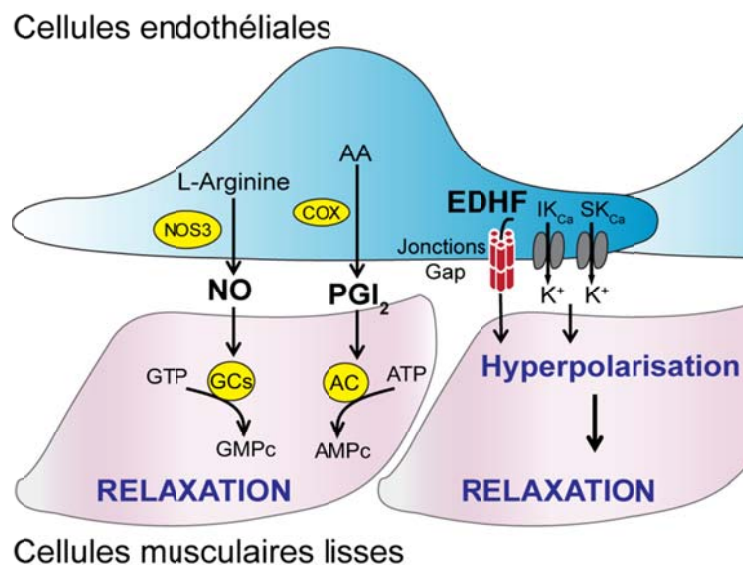
### 1.3 Régulation du tonus vasculaire par l'endothélium

L'endothélium vasculaire est essentiel à la régulation de divers mécanismes physiopathologiques. En effet, l'endothélium est multifonctionnel : il a la capacité de réguler la réponse immunitaire, de contrôler l'hémostase et la perméabilité vasculaire, de contribuer à l'angiogenèse et la vasculogenèse, ainsi que de finement moduler le tonus vasculaire et le flux sanguin. Afin de maintenir l'équilibre vasculaire, l'endothélium agissant de façon autocrine, paracrine ou endocrine va synthétiser et sécréter divers composés vasoactifs en réponse à une variété d'hormones (AngII, insuline, vasopressine, catécholamine), de neurotransmetteurs (acétylcholine; ACh, noradrénaline, substance P) et d'autacoïdes (bradykinine; Bk, adénosine triphosphate/ adénosine diphosphate; ATP/ADP, endothéline, sérotonine, thrombine), ainsi qu'à des facteurs mécaniques (contraintes de cisaillements, étirement cyclique) et l'hypoxie. Généralement, ces agonistes vont lier des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) ou des récepteurs à tyrosine kinase (TKRs) déclenchant une série d'évènements menant à la production d'IP<sub>3</sub> et à l'augmentation du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> [50, 51]. Brièvement, la production d'IP<sub>3</sub> résulte du clivage du phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP<sub>2</sub>) par la phospholipase C (PLC) générant également le diacylglycérol (DAG). Ces seconds messagers vont ensuite engendrer diverses cascades de signalisation conduisant, entre autres, à une augmentation du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Cette augmentation de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> va gouverner différents mécanismes régulateurs fondamentaux pour la fonction endothéliale tel que le contrôle de tonus vasculaire (détaillé dans le chapitre 2, page 25).

En condition physiologique, l'endothélium maintient l'homéostasie vasculaire par la synthèse d'agents anti-inflammatoires, anti-thrombotiques et anticoagulants, alors qu'en situation pathologique il va synthétiser des facteurs pro-inflammatoires et contribuer à un environnement pro-thrombotique. Les CEs favorisent un environnement anticoagulant et non-thrombotique en exprimant à leur surface des facteurs anti-adhérents et antiagrégants (NO, PGI<sub>2</sub>) empêchant l'adhésion et l'agrégation des plaquettes et des leucocytes [52, 53]. Lors d'une réaction inflammatoire, l'endothélium activé va libérer divers composés (facteur de von Willebrand; vWF, facteur d'activation des plaquettes; PAF, activateur tissulaire du plasminogène; tPA) assurant la coagulation et l'agrégation plaquettaire [53, 54].

Un autre rôle fondamental de l'endothélium est sa capacité à réguler le tonus vasculaire et ainsi le débit sanguin et la pression artérielle en contrôlant la contraction et la relaxation des CMLVs sous-jacentes. Pour ce faire, les CE maintiennent un équilibre entre la libération de facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs. Parmi les facteurs vasodilatateurs générés par l'endothélium sont retrouvés le NO, l'EDHF et les dérivés de l'acide-arachidonique (la PGI<sub>2</sub> et les acides époxyeicosatriénoïques; EETs) qui provoquent la relaxation des CMLVs et la dilatation artérielle (Figure 3, page 11). En revanche, les facteurs vasoconstricteurs tels que la thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), l'endothéline-1 (ET-1), l'Ang II et les ROS vont engendrer une constriction artérielle par la contraction des CMLVs. Il est important de noter que la synthèse de ces différents facteurs peut varier dépendamment de l'espèce, du lit vasculaire, du stimulus, mais également de la condition physiopathologique.

Dans l'intérêt de cette thèse, les prochaines sections et chapitres de l'introduction porteront principalement sur le rôle de l'endothélium dans la régulation du tonus vasculaire.



**Figure 3. Facteurs vasodilatateurs générés par l'endothélium.**

Les cellules endothéliales (CEs) synthétisent le NO et la PGI<sub>2</sub> à partir de la NOS3 et de la COX, respectivement. Ces facteurs diffusent vers les cellules musculaires lisses (CMLVs) afin de provoquer leur relaxation. Les CE vont également générer l'EDHF, qui est un amalgame de mécanismes hyperpolarisant les CMLVs sous-jacentes. AA : acide arachidonique, AC : adénylate cyclase, AMPc : adénosine monophosphate cyclique, ATP : adénosine triphosphate, COX : cyclooxygénase, EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, GCs : guanylate cyclase, GMPc : guanosine monophosphate, GTP : guanosine triphosphate, K<sup>+</sup> : potassium, K<sub>Ca</sub>3.1 et K<sub>Ca</sub>2.3 : canaux potassiques dépendants du Ca<sup>2+</sup> de moyenne et de faible conductance, NO : oxyde nitrique, NOS3 : NO synthase endothéliale, PGI<sub>2</sub> : prostacycline.

### 1.3.1 Vasodilatation dépendante de l'endothélium

Furchgott et Zawadzki ont été les premiers à démontrer que la vasodilatation artérielle est dépendante de l'endothélium par la production du puissant facteur relaxant aujourd'hui nommé NO. Depuis, de nombreux autres facteurs dérivés de l'endothélium tels que l'EDHF et les dérivés de l'acide arachidonique ( $\text{PGI}_2$  et EETs) ont été démontrés important dans la relaxation des CMLVs et la vasodilatation artérielle (Figure 3, page 11).

#### L'oxyde nitrique

Le NO est le plus puissant composé vasodilatateur dérivé de l'endothélium qui diffuse vers le muscle lisse afin d'engendrer une relaxation des CMLVs (Figure 4, page 14). La voie de signalisation impliquant le NO semble prédominante dans les vaisseaux sanguins de gros calibres alors que l'EDHF est plus important dans les artères de petits calibres [55]. Dans les CEs, la synthèse du NO se fait *via* l'action enzymatique de la NOS3 dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  sur la L-arginine en présence de divers cofacteurs tels que le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), la flavine adénine dinucléotide/flavine mononucléotide (FAD/FMN), la tétrahydrobioptérine ( $\text{BH}_4$ ) et l'oxygène ( $\text{O}_2$ ) [56, 57]. La production de NO est modulée par divers agonistes endothéliaux pouvant augmenter le  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  tels que la Bk, la substance P, la thrombine et l'ADP, mais également par un stimulus physique (les contraintes de cisaillements). La NOS3 peut aussi être activée suite à la stimulation des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques des CMLVs. L'augmentation du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  et de l' $\text{IP}_3$  dans les CMLVs activées est transmise *via* les jonctions communicantes Gap aux CEs, stimulant ainsi une libération de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE [38, 58, 59].

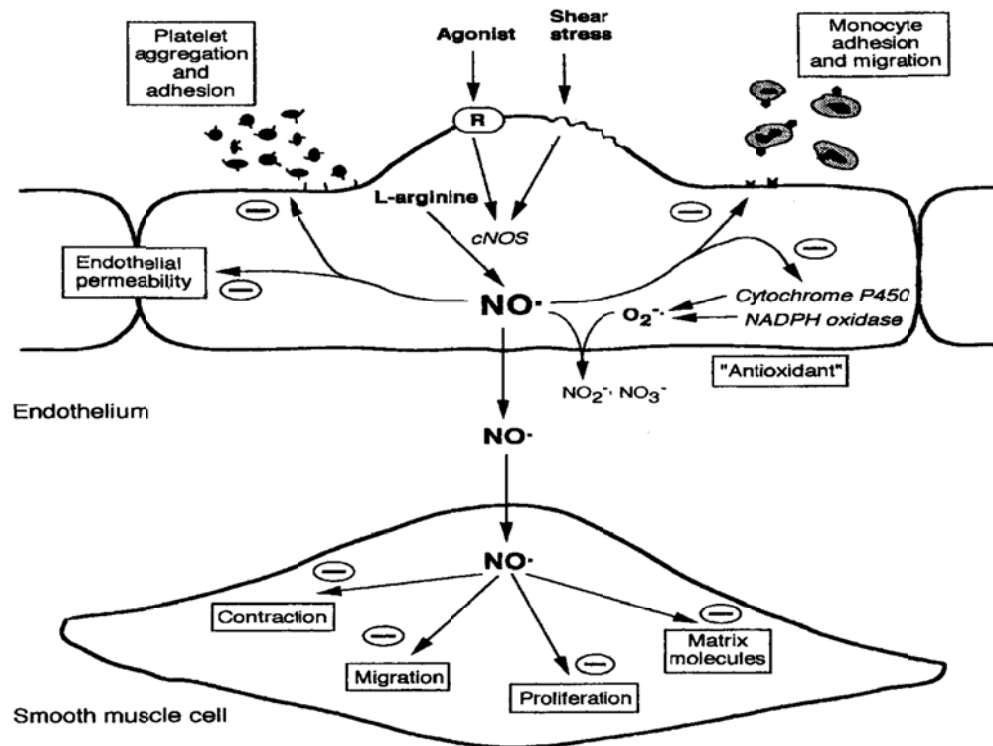
Une fois le NO synthétisé dans les CEs, il diffuse vers les CMLVs et se lie à la guanylate cyclase soluble (GCs), ce qui active l'enzyme et engendre la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) en présence de guanosine triphosphate (GTP) [60, 61]. Le GMPc active ensuite la protéine kinase G (PKG) qui induit une relaxation des CMLVs et une dilatation artérielle par divers mécanismes menant soit à la diminution du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ou à la diminution de la sensibilité du système contractile au  $\text{Ca}^{2+}$  [61, 62]. D'une part, la PKG phosphoryle les canaux  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  générant un efflux d'ions potassiques vers le milieu

extracellulaire ce qui mène à une hyperpolarisation de la membrane, bloquant ainsi l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  via les VDCC [61]. La PKG peut également activer indirectement les canaux  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  via une libération locale de  $\text{Ca}^{2+}$  engendrée par la phosphorylation des RyRs. D'autre part, la PKG peut directement phosphoryler les canaux calciques de type L, provoquant une inhibition du canal et ainsi une diminution de la concentration globale en  $\text{Ca}^{2+}$  [63]. Enfin, la PKG va induire une relaxation des CMLVs en diminuant la sensibilité du système contractile au  $\text{Ca}^{2+}$  par la phosphorylation de MLCP.

Il est intéressant de noter que récemment une étude a identifié la présence de NOS3 au niveau des PME d'artères de résistance, ce qui réduirait la distance de diffusion du NO vers les CMLVs [49]. D'ailleurs, des évidences suggèrent que NOS3 ainsi que le NO interagissent avec les différentes connexines (Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45) des jonctions communicantes Gap [64]. En effet, le NO semble pouvoir stimuler ou inhiber l'ouverture des jonctions communicantes Gap par *s*-nitrosylation dépendamment du type de connexines, de la localisation des jonctions et du lit vasculaire. Il a été démontré que dans un modèle de co-culture de CEs et de CMLVs ainsi que dans des artères intactes, le NO augmente la communication intercellulaire au niveau des PME où les Cx43 et la NOS3 ont été localisés [49] (pour une revue de la littérature voir [64]). D'autre part, la NOS3 semble également être directement associée aux connexines, modulant ainsi la communication entre les CMLVs et les CEs. Des études de co-immunoprécipitation et d'hybridation *in situ* PLA (*proximity ligation assay*) ont montré que Cx40, Cx37 et NOS3 semblent former un complexe dans les CEs aortiques [64]. D'ailleurs, l'extrémité C-terminale de la Cx37 possède un domaine de liaison à la NOS3 [65]. Il a été suggéré que l'interaction entre ces deux protéines régule négativement chacune de leur fonction, diminuant ainsi la conductance du canal et la production de NO respectivement. L'interaction entre les Cx et la NOS3 dans les CEs aortique a également été suggérée par des études *in vivo* [66].

En résumé, la NOS3 ainsi que le NO régulent le tonus vasculaire par divers mécanismes. Néanmoins, leur implication dans la fonction vasculaire ne s'arrête pas au contrôle du tonus vasculaire. Au niveau des CMLVs, le NO peut également inhiber la migration et la prolifération des cellules ainsi qu'inhiber la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire.

D'un autre côté, le NO peut réguler l'hémostase en diffusant vers le sang et inhiber l'adhésion et l'agrégation plaquettaire, en plus d'être impliqué dans le processus de la fibrinolyse (Figure 4) [11, 52, 67]. Enfin, au niveau du pôle luminal des CEs, le NO est rapidement capté par l'hémoglobine des érythrocytes et également inactivé par les radicaux oxygénés tels que l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ).



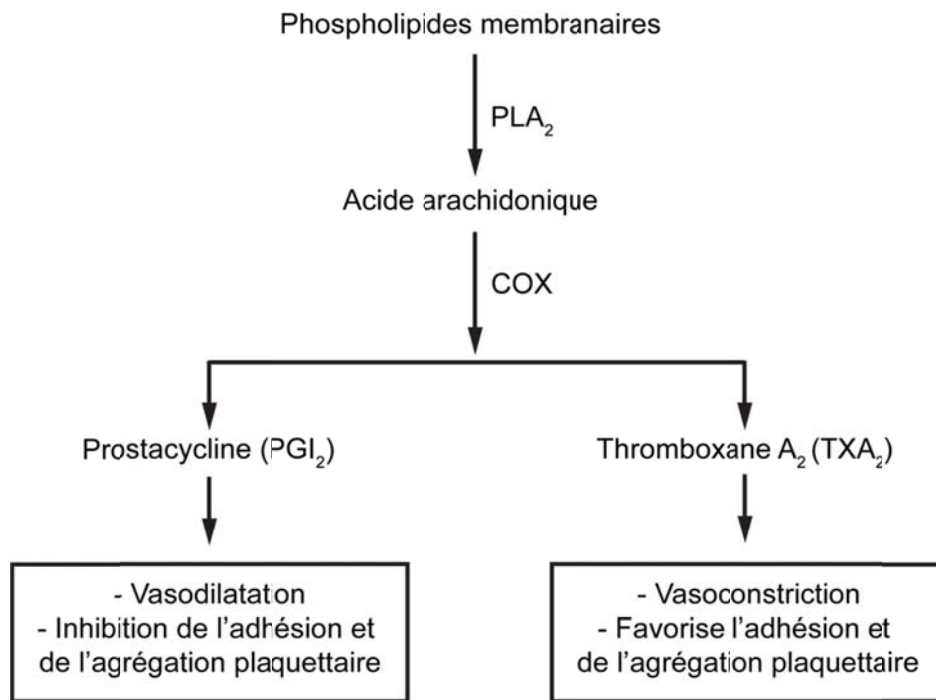
**Figure 4. Les multiples effets du NO endothélial sur l'homéostasie vasculaire.**

Représentation schématique des multiples effets du NO synthétisé par l'endothélium sur l'homéostasie vasculaire. eNOS : NO synthase endothéliale, NO : oxyde nitrique,  $NO_2^-$  : nitrite,  $NO_3^-$  : nitrate,  $O_2^-$  : superoxyde. D'après Schini-Kerth, 1999 [67].

### La prostacycline

La  $PGI_2$  de la famille des eicosanoïdes est synthétisée dans l'endothélium principalement par la voie de la cyclooxygénase (COX) à partir de l'acide arachidonique qui est libéré des phospholipides membranaires par la phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>) dépendante du  $Ca^{2+}$  (Figure 5, page 15). La production de  $PGI_2$  est donc sensible à une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  générée en réponse à des agonistes endothéliaux (ACh, Bk, ATP, etc.) ainsi qu'à des stimuli physiques

tels que les contraintes de cisaillements ou encore l'hypoxie. La  $\text{PGI}_2$ , comme le NO, est un puissant agent vasodilatateur pouvant également inhiber l'adhésion et l'agrégation plaquettaire au niveau des CEs. Ce composé vasoactif va agir en synergie avec le NO pour maintenir une homéostasie vasculaire. Des études sur des souris *knock-out* (souris n'exprimant plus le gène d'intérêt) de la NOS3 ( $\text{NOS3}^{-/-}$ ) ont montré un mécanisme compensatoire qui implique la contribution de la voie des  $\text{PGI}_2$  dans la réponse vasculaire dépendante de l'endothélium [68, 69]. La  $\text{PGI}_2$  diffuse vers les CMLVs pour induire une relaxation des myocytes suite à l'activation de leurs récepteurs IP couplés aux protéines G, par la voie de l'adénylate cyclase (AC). Cette voie de signalisation semble également impliquer l'ouverture de canaux potassiques à rectification entrante (*inwardly rectifying*);  $\text{K}_{\text{ir}}$ , sensibles à l'ATP;  $\text{K}_{\text{ATP}}$  et  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ , soit *via* l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) ou la protéine G stimulatrice ( $\text{G}_s$ ) [70, 71].



**Figure 5. Voies de signalisations de la biosynthèse des prostanoïdes.**

COX : cyclooxygénase,  $\text{PLA}_2$  : phospholipase A2.

## Le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

L'EDHF consiste en un composé ou un signal électrique généré par l'endothélium, indépendant du NO et de la PGI<sub>2</sub>, menant à l'hyperpolarisation et la relaxation des CMLVs [72, 73]. La nature de ce signal implique divers facteurs pouvant varier selon le lit vasculaire et l'espèce. Parmi ces facteurs, de nombreuses études ont révélé que l'EDHF inclut des substances diffusibles telles que le potassium (K<sup>+</sup>), les EETs et le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en plus d'une implication importante des PMEs (Figure 6, page 19) (revue de la littérature [74, 75]).

Les facteurs hyperpolarisants peuvent diffuser à travers les membranes ou *via* les jonctions communicantes gap (Cx37, Cx40 et Cx43) des PMEs [76]. En effet, les jonctions gap ainsi que les PMEs sont d'importantes composantes impliquées dans le mécanisme de l'EDHF. Dans les artères mésentériques de rat, une inhibition des jonctions gap par la carbenoxolone altère les réponses vasculaires induites par l'EDHF [77]. Similairement, des souris Cx40<sup>-/-</sup> ont démontré une diminution importante de la réponse dilatatrice en présence d'ACh ou de Bk [78, 79]. D'un autre côté, contrairement à la voie de signalisation dépendante du NO, l'importance de l'EDHF semble augmenter plus le diamètre du vaisseau sanguin diminue [55, 80, 81]. Cette observation corrèle avec la structure des vaisseaux qui montrent que le nombre de PMEs et de fenestrations dans la IEL est inversement proportionnel au calibre du vaisseau [12, 28, 31]. Ceci s'illustre par l'exemple mentionné précédemment, les CEs de l'artère fémorale ne génère pas une dilatation dépendante de l'EDHF, corrélant avec la structure de ce vaisseau qui ne possède pas de PMEs [32].

Malgré que la nature des mécanismes de l'EDHF semble toujours être controversée, il est maintenant bien établi qu'elle implique entre autres l'activation des canaux potassiques Ca<sup>2+</sup>-dépendant de faible conductance (K<sub>Ca</sub>2.3 ou SK<sub>Ca</sub>) et les canaux K<sub>Ca</sub>3.1 exprimés à la membrane plasmique des CEs (revue de la littérature [74, 75]). En effet, la relaxation des CMLVs ainsi que la vasodilatation subséquente sont complètement abolies en présence d'apamine et de charybdotoxine, les inhibiteurs respectifs des canaux K<sub>Ca</sub>2.3 et K<sub>Ca</sub>3.1 de l'endothélium. L'ouverture des canaux K<sub>Ca</sub>2.3 et K<sub>Ca</sub>3.1 est provoquée suite à une augmentation du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en réponse à des agonistes endothéliaux ou des stimuli physiques.

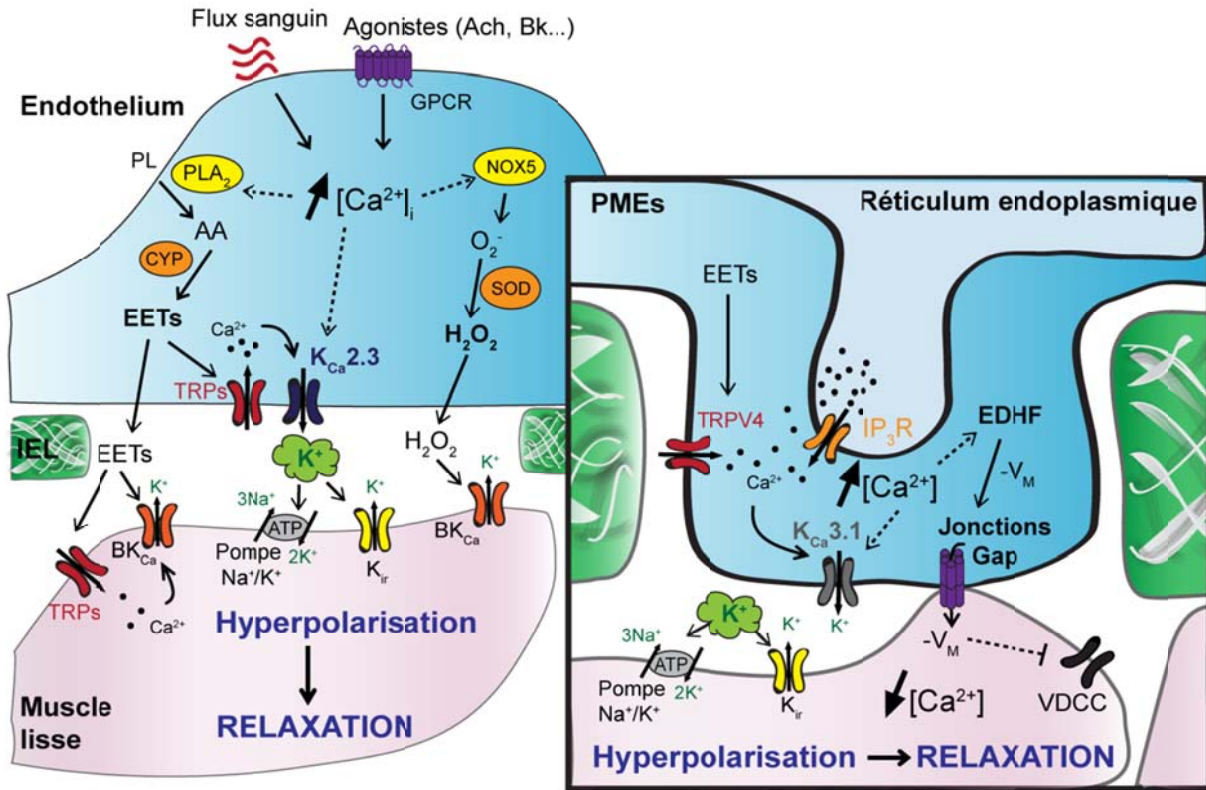


Ainsi, leur ouverture génère un efflux potassique vers le milieu extracellulaire (selon le gradient de concentration), engendrant une hyperpolarisation de la membrane [82-84]. Cette hyperpolarisation est ensuite transmise aux CMLVs sous-jacentes *via* les jonctions Gap au niveau des PMEs [76, 85]. Ceci favorise une relaxation des myocytes par la diminution de la probabilité d'ouverture des canaux VDCC présents au niveau de la membrane plasmique des CMLVs [86]. De plus, l'efflux de  $K^+$  dans l'espace myoendothélial, communément appelé nuage potassique, peut également activer les canaux  $K_{ir}$  et les pompes  $Na^+/K^+$  ATPase des CMLVs afin de potentialiser leur relaxation [87, 88]. Ainsi, une hyperpolarisation des CMLVs empêche l'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  et la dépolarisation de la membrane, pouvant mener à la vasoconstriction. Enfin, il a été établi que l'EDHF est un mécanisme indépendant du NO et de la  $PGI_2$ . En présence d'inhibiteurs de la NOS3 et des COXs, des agonistes (ACh, Bk) endothéliaux ont la capacité de provoquer l'hyperpolarisation et la relaxation du muscle lisse [72, 73].

Outre l'activation des canaux  $K_{Ca2.3}$  et  $K_{Ca3.1}$ , l'EDHF semble également inclure les EETs, un composé vasodilatateur synthétisé par le cytochrome P450 (CYP450) dérivé de l'acide arachidonique [89]. En effet, de nombreuses études sur des artères coronariennes d'origine bovine, porcine, canine ou humaine ont démontré que les EETs endothéliaux sont une composante importante de l'EDHF en hyperpolarisant les CMLVs (revue de la littérature [90]). Les EETs synthétisés dans l'endothélium diffusent à travers les membranes afin d'augmenter la probabilité d'ouverture des canaux  $BK_{Ca}$  des CMLVs et ainsi provoquer une hyperpolarisation [91]. Une autre voie de signalisation implique l'activation des canaux TRPs de la famille des vanilloïdes 4 (TRPV4) présents au niveau des CMLVs par les EETs, engendrant un influx localisé de  $Ca^{2+}$  et subséquemment l'activation des canaux  $BK_{Ca}$  [91-93]. D'autres évidences proposent que les EETs vont favoriser la transmission de l'hyperpolarisation des CEs aux CMLVs en modulant les jonctions Gap [94]. De plus, les EETs vont être associés à une hyperpolarisation des CEs par l'ouverture des canaux  $K_{Ca2.3}$  et  $K_{Ca3.1}$  sous un mécanisme similaire aux CMLVs, impliquant les canaux TRPV4 (ou TRPC3/C6 dans les artères mésentériques et TRPA1 dans les artères cérébrales) [48, 91, 93, 95-97]. Parmi les hypothèses suggérées, l'une implique la contribution des canaux TRPV4 à la formation d'un influx calcique endothélial, suivi d'une activation des canaux  $K_{Ca3.1}$  au niveau

des PMEs et conséquemment une hyperpolarisation des CEs transmise au muscle lisse. Néanmoins, l'activation des canaux TRPV4 peut également être directement régulée par le précurseurs des EETs, l'acide arachidonique [96, 98]. De plus, des études récentes ont montré que chez les souris TRPV4<sup>-/-</sup>, la vasodilatation artérielle modulée par l'EDHF est significativement atténuée comparativement aux souris contrôles, suggérant un rôle prépondérant des canaux TRPV4 dans ce mécanisme [99].

Enfin, plusieurs autres substances telles que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le nitroxyde (HNO), le monoxyde de carbone (CO), le sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S), les endocannabinoïdes et le peptide natriurétique de type C (CNP) sont également impliquées dans le mécanisme de l'EDHF (revue de la littérature [74, 100]). Les composantes de l'EDHF vont particulièrement varier selon l'espèce animale et le lit vasculaire.



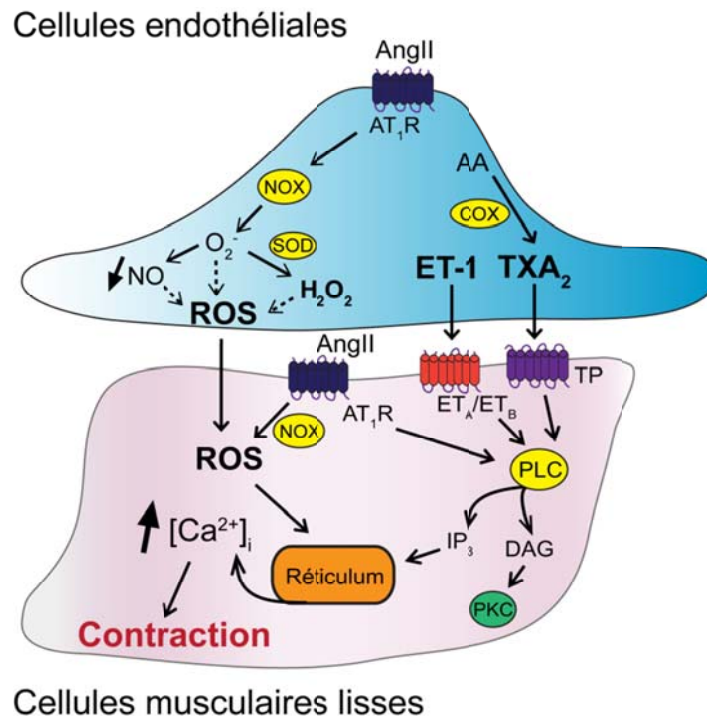
**Figure 6. Les voies de signalisations impliquées dans le l'EDHF.**

Les contraintes de cisaillement et les agonistes endothéliaux augmentent le  $[Ca^{2+}]_i$ , activant les enzymes dépendantes du  $Ca^{2+}$  ( $PLA_2$  et  $NOX5$ ) et les canaux  $K_{Ca2.3}$  et  $K_{Ca3.1}$ , ce qui stimule la production des EETs, des ROS et d'un efflux potassique. Les EETs et l' $H_2O_2$  diffusent vers le muscle lisse pour agir sur les canaux  $BK_{Ca}$ . Les EETs active également les canaux TRPs de l'endothélium et du muscle lisse, générant un influx calcique local pouvant activer les canaux potassiques sensibles au  $Ca^{2+}$ . L'efflux de  $K^+$  génère un nuage potassique dans l'espace myoendothéliale, activant ainsi les canaux  $K_{ir}$  et les pompes  $Na^+/K^+$  ATPases. Au niveau des PME, l'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  provenant du RE active les canaux  $K_{Ca3.1}$ , également activés par l'influx calcique généré par les TRPV4 et provoque une hyperpolarisation de la membrane. Cette hyperpolarisation est transmise *via* les jonctions Gap vers le muscle lisse, inhibant ainsi les canaux VDCC.

AA : acide arachidonique, ACh : acétylcholine, Bk : bradykinine,  $BK_{Ca}$  : canaux potassiques de grande conductance dépendants du  $Ca^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  : calcium, CYP : cytochrome P450, EDHF : facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium, EETs : les acides époxyeicosatriénoïques,  $H_2O_2$  : peroxyde d'hydrogène, IEL : lamina élastique interne,  $IP_3R$  : récepteur à l'inositol 1,4,5-trisphosphate ( $IP_3$ ),  $K^+$  : potassium,  $K_{Ca2.3}$  : canaux potassiques de faible conductance dépendants du  $Ca^{2+}$ ,  $K_{Ca3.1}$  : canaux potassiques de moyenne conductance dépendant du  $Ca^{2+}$ ,  $K_{ir}$  : canaux potassiques à rectification entrante,  $Na^+$  : sodium,  $NOX5$  : NADPH oxydase dépendante du  $Ca^{2+}$ ,  $O_2^-$  : superoxyde, PME : projections myoendothéliales, RE : réticulum endoplasmique, SOD : superoxyde dismutase, TRPs : canaux à potentiel de récepteur transitoire (TRPV4), VDCC : canaux calciques dépendants du voltage,  $-V_M$  : hyperpolarisation.

### 1.3.2 Vasoconstriction dépendante de l'endothélium

Parmi les principaux facteurs vasoconstricteurs synthétisés et libérés par l'endothélium, la  $\text{TXA}_2$ , l'ET-1, les ROS et l'AngII sont impliqués dans la régulation du tonus vasculaire en conditions physiopathologiques (Figure 7, page 20) [101]. Les ROS et l'AngII seront détaillés plus amplement dans le chapitre 4 (page 76). L'endothélium fonctionnel va constamment maintenir un équilibre entre la formation de facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs pour réguler l'homéostasie vasculaire. Toutefois, en conditions pathologiques (athérosclérose, hypertension, diabète, etc.), une augmentation de la synthèse et libération de facteurs vasoconstricteurs, ainsi qu'une diminution des agents vasodilatateurs sont souvent associées à une dysfonction endothéliale [102, 103].



**Figure 7. Facteurs vasoconstricteurs générés par l'endothélium.**

Les cellules endothéliales (CEs) synthétisent l'ET-1, la  $\text{TXA}_2$ , l'AngII et les ROS, comme facteurs contractants pouvant diffuser vers les cellules musculaires lisses afin de provoquer leur contraction.

AA : acide arachidonique, AngII : angiotensine II,  $\text{AT}_1\text{R}$  : récepteurs  $\text{AT}_1$  à l'AngII,  $\text{Ca}^{2+}$  : calcium, CYP : cytochrome P450, COX : cyclooxygénase, DAG : diacylglycérol, ET-1 : endothéline-1,  $\text{ET}_\text{A}/\text{ET}_\text{B}$  : récepteurs A et B de l'endothéline-1,  $\text{H}_2\text{O}_2$  : peroxyde d'hydrogène,  $\text{IP}_3$  : inositol triphosphate, NOX5 : NADPH oxydase dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{O}_2^-$  : superoxyde, PLC : phospholipase C, PKC : protéine kinase C, ROS : espèces réactives à l'oxygène, TP : récepteurs à la  $\text{TXA}_2$ ,  $\text{TXA}_2$  : thromboxane  $\text{A}_2$ .

## **La thromboxane A<sub>2</sub>**

La TXA<sub>2</sub>, similairement à la PGI<sub>2</sub>, est un dérivé de la COX1/2 qui dépend initialement de la PLA<sub>2</sub> qui synthétise le précurseur de tous les prostanoïdes : l'acide arachidonique (Figure 5, page 15). Au niveau des CEs, l'activation des récepteurs de la TXA<sub>2</sub> (TP) inhibe la production de NO. Par ailleurs, la TXA<sub>2</sub> synthétisée dans les CEs peut également activer les récepteurs TP au niveau des CMLVs pour induire la contraction [104]. Brièvement, l'activation de GPCRs, résulte en une augmentation d'IP<sub>3</sub> et de DAG suite à l'activation de la PLC, engendrant une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$ , ce qui induit une contraction du muscle lisse (Figure 7, page 20) [105]. L'activation de ces récepteurs inhibe également la voie de l'adénylate cyclase, provoquant ainsi la vasoconstriction. Ceci a été mis en évidence par des travaux de l'équipe de Paul Vanhoutte qui ont montré une contraction de la veine fémorale de chien dépendante de l'acide arachidonique endothéliale [106]. Cette contraction dépendante de l'endothélium est abolie en présence d'inhibiteurs de COXs. Néanmoins, il est important de noter qu'en condition physiologique, le principal métabolite de la voie des COXs est la PGI<sub>2</sub> [107]. Outre son action sur la contraction des CMLVs, la TXA<sub>2</sub> oppose les effets de la PGI<sub>2</sub> en étant également un facteur stimulant pour l'agrégation plaquettaire et la thrombose, ainsi que la prolifération cellulaire.

## **L'endothéline-1**

La stimulation de l'endothélium par différentes substances (thrombine, catécholamines, interleukine 1, etc.) provoque la synthèse de l'ET-1, un puissant peptide vasoconstricteur qui cible principalement les GPCRs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> au niveau des CMLVs. L'activation de ces récepteurs mène à une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  et de la sensibilité au Ca<sup>2+</sup> de l'appareil contractile *via* la voie de la PLC/DAG/IP<sub>3</sub> (Figure 7, page 20). Toutefois, ET-1 peut également agir de façon autocrine en stimulant le récepteur ET<sub>B</sub> présent sur la membrane des CEs et par conséquent stimuler la production des facteurs vasodilatateurs endothéliaux (NO, PGI<sub>2</sub> et EDHF) (revue de la littérature [108]).

## Les espèces réactives à l'oxygène

En réponse à divers stimuli tels que les agonistes endothéliaux et les contraintes de cisaillements, mais également de façon spontanée, les CEs produisent différents types d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) [109]. Les plus importantes incluent les radicaux libres oxygénés, l' $O_2^-$  qui est à l'origine des autres ROS, soit le radical hydroxyle ( $OH^\cdot$ ), ainsi que les puissantes substances oxydantes, l' $H_2O_2$  et le peroxy-nitrite ( $ONOO^-$ ). En condition physiologique, les ROS sont importantes dans le maintien de l'homéostasie vasculaire par leurs implications dans divers mécanismes (signalisation cellulaire, expression génique, métabolisme, prolifération cellulaire, etc.) [110, 111]. L'endothélium fonctionnel maintient constamment un équilibre physiologique entre la production et l'élimination des ROS, afin de préserver un état redox basal. Parmi les principales sources de ROS dans les CEs, la NADPH oxydase semble être prédominante sans toutefois négliger la xanthine oxydase, la NOS3 (découplée), les enzymes métabolisant l'acide arachidonique (les COX, les réductases du CYP450 et les lipoxygénases) ainsi que la respiration mitochondriale. À l'opposé, l'élimination des ROS se fait par des antioxydants endogènes tels que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathion peroxydase et des antioxydants exogènes (les vitamines antioxydantes C et E). L'étude des ROS au niveau vasculaire est souvent associée à des pathologies telles que l'hypertension artérielle, l'athérosclérose et le diabète, où l'équilibre redox tend vers un état pro-oxydant [112]. Ce déséquilibre est défini par le stress oxydant qui est plus amplement détaillé dans le chapitre 4 (page 76).

Les ROS vont agir tant au niveau des CEs que des CMLVs afin de réguler le tonus vasculaire. De nombreuses études semblent révéler des résultats contradictoires concernant l'impact des ROS sur le tonus vasculaire dépendamment du type de ROS, de leur concentration intracellulaire, du lit vasculaire étudié et des conditions expérimentales. De façon générale, dans les CEs l' $O_2^-$  va réagir avec le NO pour former le  $ONOO^-$ , diminuant ainsi la biodisponibilité du NO, ce qui atténue l'effet vasodilatateur et favorise la vasoconstriction. L'augmentation du stress oxydant est souvent associée à une diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium. Les ROS vont également favoriser la contraction en participant à la mobilisation du  $[Ca^{2+}]_i$  dans les CMLVs. Au niveau de CMLVs, les ROS inhibent les

pompes  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase du réticulum sarco/endoplasmique (SERCA) et la dégradation de l' $\text{IP}_3$ , ce qui résulte en une augmentation du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  suivie d'une vasoconstriction [113, 114]. Il est intéressant de noter que les ROS peuvent moduler les dynamiques calciques dans les deux types cellulaires. De nombreuses études ont démontré une altération de la signalisation calcique endothéliale en présence d' $\text{O}_2^-$  ou de  $\text{H}_2\text{O}_2$  [113-117]. Sachant que le  $\text{Ca}^{2+}$  est primordial pour les diverses fonctions endothéliales, il est raisonnable de penser que les ROS pourraient être également impliqués à leurs régulations (revue de la littérature [118]). La relation entre les ROS et les dynamiques calciques est détaillée plus amplement dans le chapitre 4 (page 76). Enfin, l'influence qu'ont les ROS sur la fonction endothéliale est plus importante en conditions pathologiques associées à une dysfonction endothéliale.

Il faut noter que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  fait souvent exception à la règle puisque de nombreuses études ont démontré son implication dans la vasodilatation dépendante de l'endothélium dans divers lits vasculaires [119-123].

## **L'angiotensine II**

L'endothélium va également synthétiser de façon locale l'AngII à partir de l'AngI *via* l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) exprimée à la surface membranaire [124]. L'AngII peut agir de façon autocrine et paracrine en activant les GPCRs  $\text{AT}_1$  et  $\text{AT}_2$  des CEs et CMLVs. Ce peptide est le principal effecteur du système RAS (système rénine angiotensine) permettant de réguler la pression artérielle (détaillé dans le chapitre 5, page 94).

D'une part, l'AngII est un puissant agent vasoconstricteur dont les effets pharmacologiques sont principalement induits suite à l'activation des récepteurs  $\text{AT}_1$  exprimés à la membrane des CEs et des CMLVs. Au niveau des CMLVs, une stimulation de ces récepteurs provoque l'activation de la PLC, ce qui mène à la production d' $\text{IP}_3$  et subséquemment une augmentation du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Figure 7, page 20). Cette augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  est responsable de plusieurs effets physiologiques dont l'activation de kinases pouvant phosphoryler la myosine, engendrant ainsi la contraction des CMLVs. La signalisation induite par l'activation des récepteurs  $\text{AT}_1$  implique également la stimulation de la production des ROS principalement par l'activation de la NADPH oxydase, tant au niveau endothélial que musculaire. De plus, AngII stimule la

PLA<sub>2</sub> provoquant une augmentation de la production d'acide arachidonique et de son dérivé la TXA<sub>2</sub> comme puissant agent vasoconstricteur [101, 102, 104, 125-127]. La stimulation de la production d'ET-1 est également observée en présence d'AngII. Enfin, les conséquences d'une activation chronique des récepteurs AT<sub>1</sub> par l'AngII sont généralement associées à une dysfonction endothéliale (détaillée dans le chapitre 4, page 76).

D'autre part, de nombreuses études stipulent qu'une stimulation des récepteurs AT<sub>2</sub> présents au niveau des CEs contre les effets d'une activation des récepteurs AT<sub>1</sub>, suggérant un rôle des récepteurs AT<sub>2</sub> dans la protection vasculaire [128, 129]. En effet, AngII, *via* les récepteurs AT<sub>2</sub>, va également participer à la vasodilatation principalement en stimulant la production de NO. Des études suggèrent aussi un rôle des récepteurs AT<sub>2</sub> dans la production de l'acide arachidonique et de ces dérivés (EETs), ainsi que de la Bk, qui tous deux seraient impliquées dans la relaxation des CMLVs (revue de la littérature [130]). Enfin, AngII n'est pas uniquement impliqué dans la régulation du tonus vasculaire, mais également dans l'inflammation et l'agrégation plaquettaire. Les effets physiopathologiques des deux récepteurs sur la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension artérielle seront plus amplement discutés dans les chapitres 4 et 5.

En résumé, le contrôle du tonus vasculaire dépend de plusieurs facteurs générés par les CEs vasculaires. Ainsi, l'endothélium fonctionnel maintient constamment un équilibre entre la vasodilatation et la vasoconstriction artérielle. Les différents mécanismes régulateurs impliqués dans la fonction endothéliale requièrent essentiellement le Ca<sup>2+</sup>, d'où l'importance d'une compréhension approfondie des dynamiques calciques endothéliales.



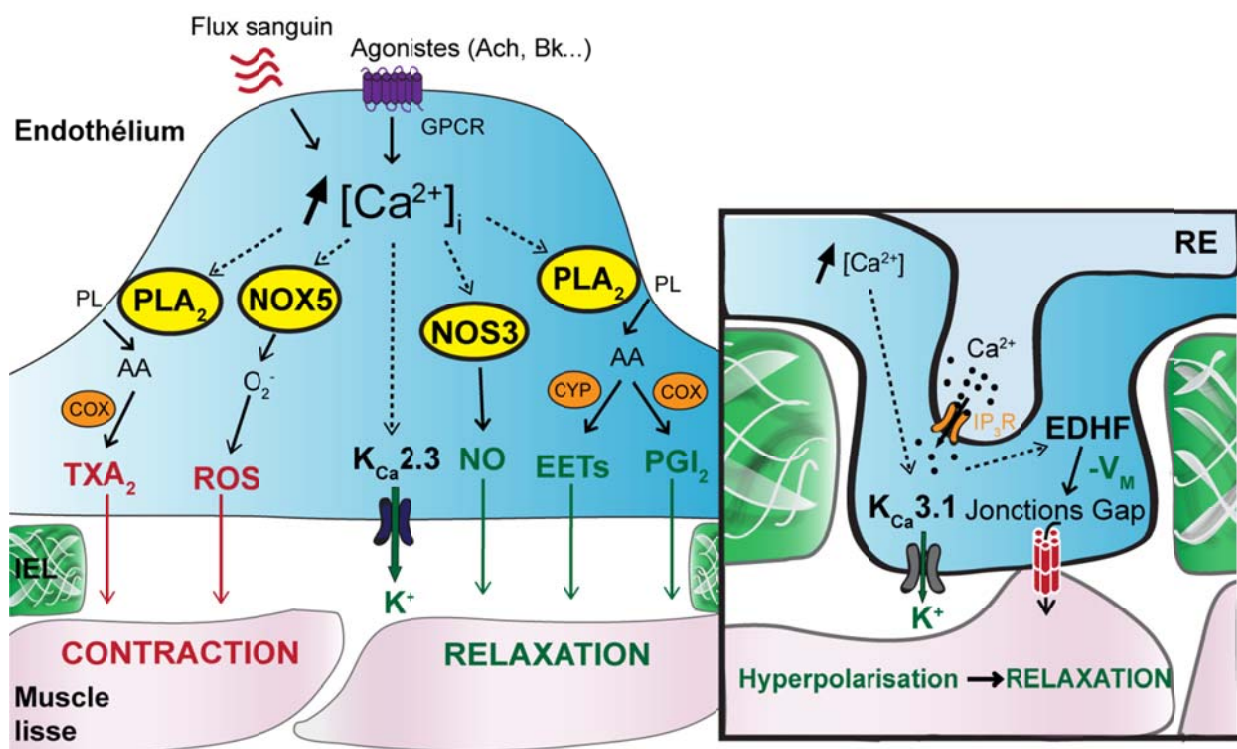
## Chapitre 2 - L'homéostasie calcique endothéliale

Au fil des années de multiples recherches réalisées sur l'endothélium ont mené à la découverte de l'importance qu'a l'homéostasie calcique sur la régulation des différentes fonctions endothéliales. Les fonctions endothéliales telles que la régulation du tonus vasculaire, l'hémostase et la thrombolyse, la perméabilité vasculaire, la prolifération cellulaire et l'angiogenèse sont régies par le  $[Ca^{2+}]_i$  [1, 2, 11, 131]. Le niveau de  $[Ca^{2+}]_i$  peut varier de façon spontanée, en réponse à l'activation d'un récepteur par un agoniste ou en réponse à un stimulus mécanique, comme les contraintes de cisaillements. Ces variations calciques sont classées principalement en deux catégories : les signalisations globales ou locales du  $[Ca^{2+}]_i$  qui se distinguent par leurs propriétés spatiotemporelles. Enfin, la régulation des dynamiques calciques implique plusieurs protéines ayant chacune un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie calcique endothéliale. Par conséquent, une perturbation de l'homéostasie calcique peut engendrer une dysfonction endothéliale menant à des pathologies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose et l'hypertension artérielle [10, 11, 132-136].

### 2.1 Les médiateurs endothéliaux dépendants du $Ca^{2+}$

L'endothélium synthétise et libère différents médiateurs importants pour les fonctions endothéliales. Le contrôle du tonus vasculaire nécessite un équilibre constant entre la production de facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs [2]. Parmi les agents vasodilatateurs, les CEs vont générer le NO, la  $PGI_2$ , les EETs et l'EDHF, dont leur régulation nécessite essentiellement la présence de  $Ca^{2+}$  (Figure 8, page 26). Quant aux facteurs vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium tels que la  $TXA_2$  et les ROS (détaillés dans le chapitre 4, page 76), leur synthèse requière également le  $Ca^{2+}$  (Figure 8, page 26). Certains de ces facteurs vont également intervenir dans d'autres fonctions endothéliales telles que l'agrégation plaquettaire, la prolifération cellulaire et l'angiogenèse [11]. D'autre part, le vWF, le tPA et le PAF, impliqués dans l'hémostase et la thrombolyse, sont aussi régulés par le  $[Ca^{2+}]_i$  [131, 137, 138]. Généralement, ces facteurs entreposés dans des vésicules vont être libérés suite à une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  par un processus d'exocytose dépendant du complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline ou encore leur synthèse va exiger du  $Ca^{2+}$  [131, 137].

Cette thèse va principalement porter sur l'importance qu'a le  $[Ca^{2+}]_i$  sur la synthèse des facteurs vasoactifs permettant de réguler le tonus vasculaire. Ultérieurement, nous discuterons des différentes dynamiques calciques endothéliales pouvant être impliquées dans la régulation des fonctions endothéliales.



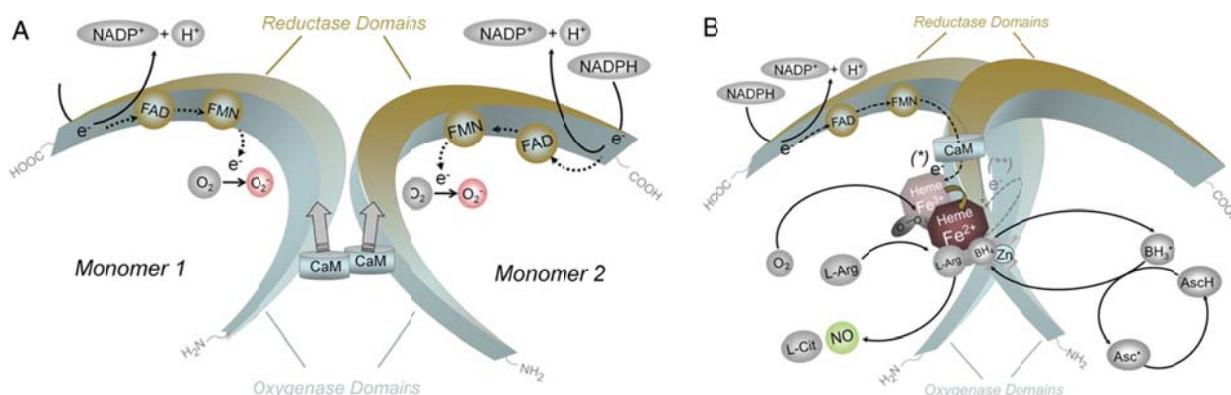
**Figure 8. Les Médiateurs endothéliaux dépendants du  $Ca^{2+}$ .**

La synthèse des nombreux facteurs vasoactifs de l'endothélium (TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, EETs, ROS, NO), ainsi que les mécanismes impliqués dans l'EDHF, nécessitent une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  de façon globale ou localisée (PMEs) afin d'activer les protéines dépendantes du  $Ca^{2+}$  (PLA<sub>2</sub>, NOX5, NOS3, K<sub>Ca</sub>2.3 et K<sub>Ca</sub>3.1) impliquées dans leur production.

AA : acide arachidonique, ACh : acétylcholine, Bk, bradykinine,  $Ca^{2+}$  : calcium, COX : cyclooxygénase, CYP : cytochrome P450, EDHF : facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium, EETs : les acides époxyeicosatriénoïques,  $H_2O_2$  : peroxyde d'hydrogène, IEL : lamina élastique interne, IP<sub>3</sub>R : récepteur à l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>), K<sup>+</sup> : potassium, K<sub>Ca</sub>2.3 et K<sub>Ca</sub>3.1 : canaux potassiques de faible et de moyenne conductance dépendants du  $Ca^{2+}$ , respectivement, NO : oxyde nitrique, NOX5 : NADPH oxydase dépendante du  $Ca^{2+}$ ,  $O_2^-$  : superoxyde, PL : phospholipides membranaires, PLA<sub>2</sub> : phospholipase A<sub>2</sub>, PME : projections myoendothéliales, RE : réticulum endoplasmique, ROS : espèces réactives à l'oxygène, TXA<sub>2</sub> : thromboxane A<sub>2</sub>,  $-V_M$  : hyperpolarisation.

### 2.1.1 L'oxyde nitrique

Les CE jouent un rôle crucial dans le contrôle du tonus vasculaire et de l'hémostase en synthétisant le NO [1, 2]. En réponse à des stimuli physiques tels que les contraintes de cisaillements et divers agonistes endothéliaux engendrant une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$ , la NOS3 synthétise le NO par l'oxydation de la L-arginine en citrulline en présence de divers cofacteurs (NADPH, FAD/FMN, BH<sub>4</sub>, groupement hème et O<sub>2</sub>) (Figure 9, page 27) (revue de la littérature [139]) [57, 140, 141]. Ainsi, la stimulation de la production de NO requiert d'abord une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  qui provient soit des réserves intracellulaires (RE, mitochondrie) ou du Ca<sup>2+</sup> extracellulaire [57, 142, 143]. La NOS3 est la principale isoforme retrouvée dans les CE et requière essentiellement la liaison du complexe Ca<sup>2+</sup>/calmoduline pour son activation. De plus, la NOS3 requière sa dimérisation par la liaison d'une molécule d'hème au domaine oxygénase afin de permettre le transfert adéquat d'électrons provenant du domaine réductase de l'enzyme (Figure 9, page 27) [57].



**Figure 9. Mécanisme d'activation de la NOS3.**

A. La NOS3 est un monomère capable de transférer les électrons de la NADPH au FAD et au FMN. Le monomère a une capacité limitée de réduire une molécule d'oxygène en O<sub>2</sub><sup>-</sup>. La liaison de la calmoduline au monomère favorise le transfert d'électrons du domaine réductase, mais ne peut lier le cofacteur BH<sub>4</sub> et son substrat, la L-arginine, afin de produire le NO. B. En présence d'un groupement hème ferrique, la NOS3 forme un dimère fonctionnel permettant le transfert d'électrons du FMN au groupement hème du monomère opposé, générant un flux d'électrons du domaine réductase au domaine oxygénase. La NOS3 sous forme de dimère requiert une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  pour permettre la liaison de la calmoduline à son domaine. Ainsi, en présence du cofacteur BH<sub>4</sub> et du substrat L-arginine, la NOS3 fonctionnelle peut synthétiser le NO.

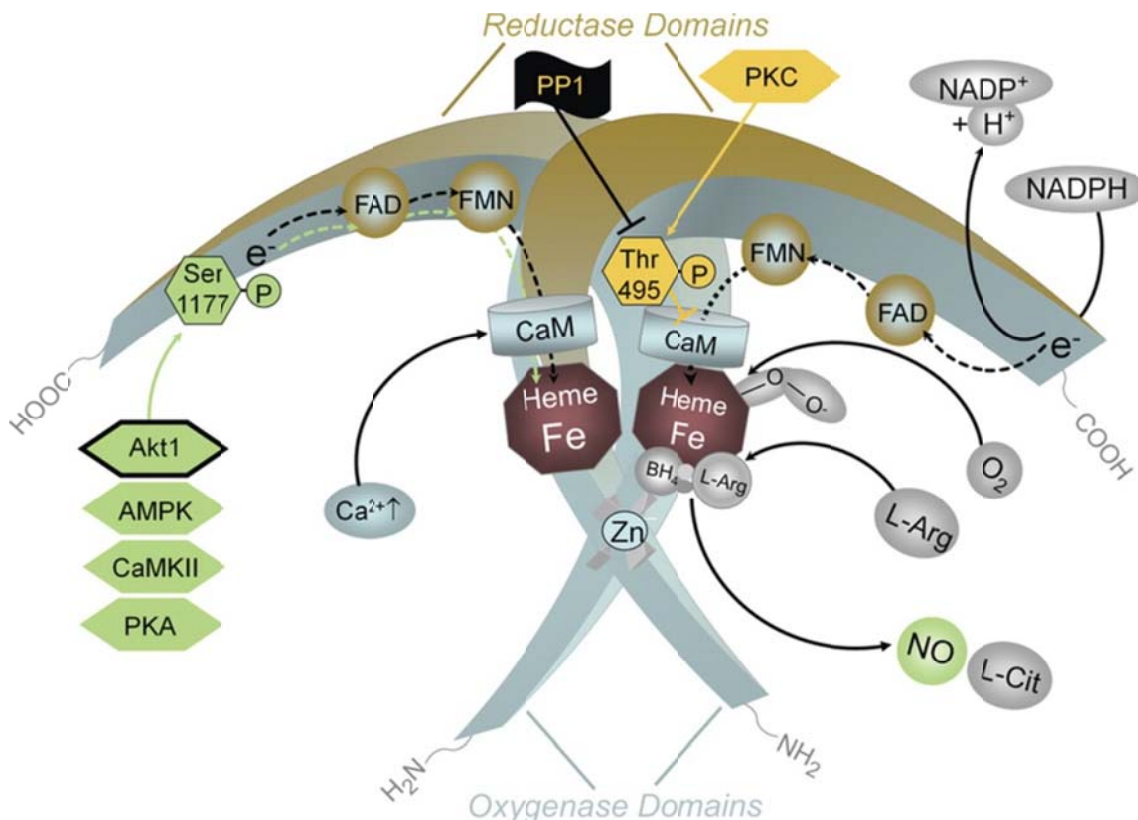
AscH : acide ascorbique, Asc : radical ascorbate, BH<sub>4</sub> : tétrahydrobioptérine, BH<sub>3</sub><sup>-</sup> : radical trihydrobioptérin, CaM : calmoduline, e<sup>-</sup> : électron, FAD : flavine adénine dinucléotide, Fe<sup>2+</sup> : fer, FMN : flavine mononucléotide, H<sup>+</sup> : hydrogène, L-Arg : L-arginine, L-Cit : L-citrulline, NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, NO : oxyde nitrique, O<sub>2</sub> : oxygène, O<sub>2</sub><sup>-</sup> : superoxyde, Zn : zinc. D'après Förstermann and Sessa 2011[139].

Au repos, la NOS3 est associée à la cavéoline présente dans les cavéolae (invaginations de la membrane plasmique). En présence d'une  $[Ca^{2+}]_i$  élevée, la liaison du complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline à la NOS3 provoque la dissociation de l'enzyme séquestrée dans les cavéolae [57, 144-146]. Contrairement à la NOS inductible (NOS2) indépendante au  $Ca^{2+}$ , la NOS3 possède un site spécifique de liaison pour la calmoduline, lui procurant ainsi sa dépendance au  $Ca^{2+}$  [147]. Des études ont démontré qu'une altération de ce domaine de liaison modifie la sensibilité de l'enzyme au  $Ca^{2+}$ . La création d'une protéine chimérique à partir de la protéine NOS2, dans laquelle la séquence codant pour le site de liaison de la calmoduline de la NOS3 a été insérée, procure à l'enzyme fonctionnelle une dépendance au  $Ca^{2+}$  et à la calmoduline [147].

Outre le complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline, l'activation et l'activité enzymatique de la NOS3 peuvent également être régulées par une phosphorylation de l'enzyme ainsi que par des protéines d'association (Hsp90; protéine de choc thermique 90, *Heat Shock Protein-90* et ENAP-1; protéine d'association à la NOS3, *Endothelial NOS-associated Protein-1*) (Figure 10, page 29). La NOS3 peut être phosphorylée par des kinases telles que l'Akt [148, 149], la protéine kinase A (PKA) [150] et la CaMKII [151-153] sur des résidus sérine (Ser1177, Ser114, Ser615, Ser633), thréonine (Thr495) et tyrosine (Tyr657, Tyr81) afin de réguler son activité [57]. CaMKII semble moduler l'activité de l'enzyme en phosphorylant le résidu Ser1177, mais également en régulant son expression génique [151-154]. Généralement, la phosphorylation de la Ser1177, Ser633 et Ser615 provoque une amplification de la production du NO, qui ne dépend alors plus du  $[Ca^{2+}]_i$  [149, 153]. À l'opposé, la phosphorylation de la Thr495, de la Ser6114 et des résidus tyrosine diminue l'activité de l'enzyme [155]. La phosphorylation de la Thr495 par la protéine kinase C (PKC) semble être constitutive dans les CEs, requérant ainsi l'action enzymatique de phosphatases pour favoriser l'activité de la NOS3.

Enfin, il est important de noter que les contraintes de cisaillements peuvent également stimuler la production de NO indépendamment de l'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  [156]. Il a été démontré que l'activation de la NOS3 par les contraintes de cisaillements diffère de celle induite par un agoniste [157]. En absence du  $Ca^{2+}$  extracellulaire ou d'un antagoniste de la calmoduline, les

contraintes de cisaillements ont la capacité d'activer la NOS3[158]. Ce processus semble impliquer une activation de l'enzyme directement par des protéines d'association telle que la Hsp90 et une phosphorylation par Akt [156, 159].



**Figure 10. Régulation de l'activité de la NOS3 par le  $\text{Ca}^{2+}$  et la phosphorylation.**

L'activation de la NOS3 nécessite l'augmentation du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , stimulant la liaison de la calmoduline à l'enzyme, ce qui favorise le transfert d'électrons de la NADPH du domaine réductase à l'hème du domaine oxygénase du monomère opposé. L'activité de la NOS3 peut être modulée par les kinases Akt, AMPK, CaMKII et PKA en réponse à divers stimuli ou agonistes endothéliaux. La phosphorylation de la NOS3 par ces kinases sur la Ser1177 du domaine réductase stimule le transfert d'électron et ainsi l'activité de l'enzyme. À l'opposé, la phosphorylation de la Thr495 par la PKC diminue l'activité de l'enzyme, requérant ainsi une déphosphorylation par la PP1.

Akt1 : kinase sérine thréonine, AMPK : kinase activée par l'AMP,  $\text{BH}_4$  : tétrahydrobioptérine, CaM : calmoduline, CaMKII : kinase II dépendante du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline,  $\text{Ca}^{2+}$  : calcium,  $e^-$  : électron, FAD : flavine adénine dinucléotide,  $\text{Fe}^{2+}$  : fer, FMN : flavine mononucléotide,  $\text{H}^+$  : hydrogène, L-Arg : L-arginine, L-Cit : L-citruline, NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, NO : oxyde nitrique,  $\text{O}_2$  : oxygène, PKA : protéine kinase A, PKC : protéine kinase C, PP1 : phosphatase 1, Zn : zinc. D'après Förstermann and Sessa 2011[139].

### 2.1.2 La prostacycline, la thromboxane A<sub>2</sub> et les acides époxyeicosatriénoïques.

Parmi les facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs, l'endothélium synthétise et libère des prostanoïdes tels que la PGI<sub>2</sub> et la TXA<sub>2</sub> ainsi que des EETs pour maintenir un équilibre hémodynamique [160]. La PGI<sub>2</sub> est impliquée dans la vasodilatation et prévient l'agrégation plaquettaire, tandis que la TXA<sub>2</sub> oppose ces effets [161]. La synthèse de PGI<sub>2</sub> et de TXA<sub>2</sub> par COX1/2 et celle des EETs par CYP450, tous dérivés de l'acide arachidonique, est catalysée par la PLA<sub>2</sub> dépendante du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> [162-164]. Il existe toutefois trois formes de PLA<sub>2</sub>, dont deux sont sensibles au Ca<sup>2+</sup> : la sécrétoire (sPLA<sub>2</sub>) et la cytoplasmique (cPLA<sub>2</sub>), qui requièrent une concentration de Ca<sup>2+</sup> de l'ordre du milli-molaire et du micro-molaire, respectivement [162, 165]. Le Ca<sup>2+</sup> permet le déplacement de la PLA<sub>2</sub> du cytosol vers les membranes phospholipidiques, particulièrement la membrane plasmique et la membrane nucléaire, afin de libérer l'acide arachidonique [166-168]. Dans les CEs, la PLA<sub>2</sub> représente la première étape de la synthèse de tous les eicosanoïdes. L'activation de la PLA<sub>2</sub> est directement régulée par des variations de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, mais aussi par la phosphorylation [168-170]. Une augmentation du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en réponse aux agonistes (ATP, Bk, thrombine, l'histamine) s'associe à une augmentation de la production de PGI<sub>2</sub> dans divers types de CEs en culture et natives [171-175]. Cette augmentation de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> est également associée à la production de tous les eicosanoïdes [170, 175, 176]. De plus, les ionophores calciques traversant la membrane plasmique des cellules provoque une augmentation du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> et une activation de la cPLA<sub>2</sub> [177]. Enfin, parmi les protéines kinases pouvant phosphoryler la PLA<sub>2</sub>, certaines sont activées par la PKC qui est également régie par le [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> [131].

### 2.1.3 Facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium

Le mécanisme général de l'EDHF se définit par la formation d'un signal électrique ou un d'un composé provenant des CEs générant une hyperpolarisation et une relaxation des CMLVs indépendamment du NO et de la PGI<sub>2</sub> [82, 90, 178]. La première étape de cette voie de signalisation implique généralement une augmentation du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> endothélial suivie d'une hyperpolarisation de la membrane des CEs [75, 179].

Il est maintenant bien établi qu'un important mécanisme par lequel l'EDHF induit une relaxation des CMLVs implique l'activation des canaux potassiques endothéliaux  $K_{Ca3.1}$  et  $K_{Ca2.3}$  sensibles au  $Ca^{2+}$  [24, 84, 180, 181]. Une augmentation globale ou locale du  $[Ca^{2+}]_i$  en réponse aux forces de cisaillements, à un agoniste ou de façon spontanée, engendre l'ouverture de ces canaux transmembranaires, qui résulte en une libération de  $K^+$  selon leur gradient électrochimique vers le milieu extracellulaire [82-84]. L'efflux de  $K^+$  provoque donc une hyperpolarisation de la membrane des CEs qui est transmise aux CMLVs *via* les jonctions gap [76, 82, 182]. De plus, l'ouverture des canaux  $K_{Ca3.1}$  et  $K_{Ca2.3}$  génère un nuage potassique dans l'espace myoendothélial, qui active les canaux potassiques  $K_{ir}$  et les pompes  $Na^+/K^+$  ATPase des CMLVs, causant ainsi leur hyperpolarisation [75, 83]. L'hyperpolarisation des CMLVs engendre ensuite la fermeture des canaux VDCC, provoquant une chute du  $[Ca^{2+}]_i$  et subséquemment une vasodilatation artérielle [83, 90]. Enfin, l'inhibition des canaux  $K_{Ca3.1}$  et  $K_{Ca2.3}$ , entre autres par la charybdotoxine et l'apamine respectivement, abolit la réponse induite par l'EDHF [183]. D'un autre côté, des études en patch clamp ont montré qu'une suppression du  $[Ca^{2+}]_i$  induite par une dialyse du milieu intracellulaire des CEs fraîchement isolées de l'aorte de souris avec une solution sans  $Ca^{2+}$  diminue significativement le courant potassique généré par les canaux  $K_{Ca3.1}$  et  $K_{Ca2.3}$  [84]. L'activation des canaux  $K_{Ca3.1}$  et  $K_{Ca2.3}$  n'est pas le seul mécanisme dépendant du  $[Ca^{2+}]_i$ , tel que mentionné dans la section précédente, les EETs également impliqués dans l'EDHF (chapitre 1, page 16) nécessitent le  $Ca^{2+}$  pour être synthétisés.

En résumé, le  $[Ca^{2+}]_i$  est primordial pour assurer le fonctionnement adéquat des mécanismes régulateurs contrôlant le tonus vasculaire. Par conséquent, il est essentiel de comprendre les différents mécanismes responsables de l'homéostasie calcique endothéliale.

## **2.2 Les mécanismes responsables de l'homéostasie calcique endothéliale**

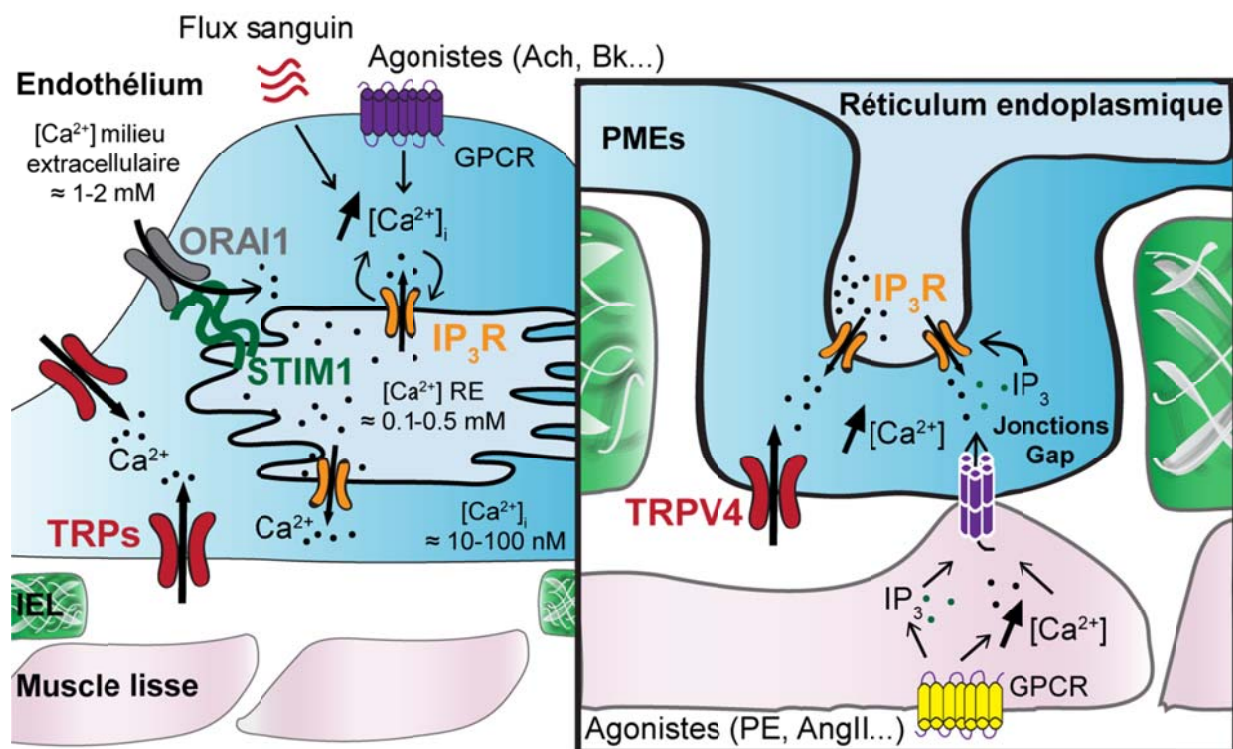
L'homéostasie calcique endothéliale est régie par de nombreuses protéines permettant un équilibre entre l'entrée de  $Ca^{2+}$  vers le cytoplasme, sa recapture vers les réserves intracellulaires, ainsi que son expulsion vers le milieu extracellulaire. Une augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  provient principalement des réserves intracellulaires (RE, mitochondrie) ainsi que du milieu extracellulaire. D'une part, cette augmentation est engendrée par l'ouverture des  $IP_3Rs$

localisés au niveau de la membrane du RE. Il est important de noter que l'endothélium natif n'exprime pas les RyRs contrairement aux CMLVs. De plus, les canaux perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  exprimés à la membrane plasmique des CEs tels que les canaux ORAI1 (*Calcium release-activated calcium channel protein 1*) et TRPs génèrent également un influx calcique. D'autre part, les pompes ATPase SERCA au niveau du RE et PMCA au niveau de la membrane plasmique, ainsi que les échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), permettent de rétablir le niveau basal du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $\approx 100$  nM). Les diverses protéines impliquées dans l'homéostasie calcique orchestrent différentes dynamiques calciques, classées entre autres selon leur cinétique et leur distribution intracellulaire distinctes. Afin de comprendre l'organisation spatiotemporelle des signalisations calciques endothéliales, il est essentiel de décrire les propriétés des différents récepteurs/canaux perméables au  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **2.2.1 Les mécanismes responsables de l'augmentation du $\text{Ca}^{2+}$ libre intracellulaire**

Un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  vers le cytoplasme est généralement causé par un agoniste activant un récepteur membranaire [184-187], par un stimulus mécanique (contraintes de cisaillements et étirement cyclique) [188-190] ou même de façon spontanée [19]. Parmi les protéines responsables de l'augmentation du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , les  $\text{IP}_3\text{Rs}$  permettent une libération de  $\text{Ca}^{2+}$  provenant du RE, alors que les canaux TRPs ainsi que les canaux ORAI1/STIM1 (*Stromal Interaction Molecule 1*) produisent un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  venant du milieu extracellulaire (Figure 11, page 33). Ces protéines sont donc les éléments essentiels menant aux différentes signalisations calciques endothéliales.





**Figure 11. Voies de signalisations impliquées dans l'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$ .**

L'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  est induite suite à l'ouverture des  $IP_3Rs$  de la membrane du RE ou l'ouverture de canaux calciques de la membrane plasmique tels que les TRPs. Une déplétion du RE stimule ensuite un influx calcique des canaux ORAI1 par la formation d'un complexe avec STIM1 de la membrane du RE. Au niveau des PMEs, l'augmentation de  $Ca^{2+}$  est causée par l'ouverture des canaux TRPV4 (ou TRPA1 au niveau cérébral) ou par l'ouverture des  $IP_3Rs$ . Ainsi l'augmentation du  $Ca^{2+}$  peut provenir du milieu extracellulaire, des réserves intracellulaires ou des cellules musculaires lisses *via* les jonctions Gap.

ACh : acétyl choline, AngII : angiotensine II, Bk : bradykinine,  $Ca^{2+}$  : calcium, IEL : lamina élastique interne,  $IP_3R$  : récepteur à l'inositol 1,4,5-trisphosphate ( $IP_3$ ), ORAI1 : *calcium release activated calcium channel protein 1*, PMEs : projections myoendothéliales, STIM1 : *stromal interaction molecule 1*, TRPs : canaux à potentiel de récepteur transitoire (TRPV4).

### Les récepteurs à l' $IP_3$

Le RE, principal réservoir de  $Ca^{2+}$ , séquestre jusqu'à 500  $\mu M$  de  $Ca^{2+}$ , correspondant à environ 75% de la réserve intracellulaire totale en  $Ca^{2+}$  [191-193]. Il permet la libération rapide et circonscrite de  $Ca^{2+}$  vers le cytoplasme *via* les  $IP_3Rs$ . Ces récepteurs jouent un rôle primordial dans l'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$ . Ils sont ainsi impliqués dans la majorité des voies de signalisations modulant la synthèse et la libération des médiateurs endothéliaux dépendants du  $Ca^{2+}$ . D'ailleurs, ils font partie des principales dynamiques calciques endothéliales tel que

nous allons en discuter dans la section 2.3. L'activation des IP<sub>3</sub>Rs est modulée par deux importants seconds messagers intracellulaires : l'IP<sub>3</sub> et le Ca<sup>2+</sup> (revue de la littérature [194]).

La synthèse d'IP<sub>3</sub> est provoquée suite à une stimulation des GPCRs ou des TKRs qui active la voie de la PLC. L'IP<sub>3</sub> se lie ensuite aux IP<sub>3</sub>Rs afin de favoriser leur ouverture et ainsi déclencher la libération du Ca<sup>2+</sup> du RE [195, 196]. La liaison de l'IP<sub>3</sub> aux IP<sub>3</sub>Rs est essentielle à son activation. Les IP<sub>3</sub>Rs sont composés de quatre sous-unités formant le pore du canal perméable au Ca<sup>2+</sup> [197]. Chaque sous-unité possède un domaine de liaison à l'IP<sub>3</sub> au niveau de l'extrémité N-terminale cytoplasmique [198]. La liaison de l'IP<sub>3</sub> engendre un changement de conformation du canal modifiant sa sensibilité au Ca<sup>2+</sup>, ce qui permet ensuite la liaison du Ca<sup>2+</sup> à son site « activateur » et la libération subséquente de Ca<sup>2+</sup> vers le milieu intracellulaire [194, 199]. Certaines études suggèrent que la liaison de l'IP<sub>3</sub> à plus d'un site est nécessaire pour ouvrir le canal sans toutefois occuper les quatre sites disponibles sur le tétramère [200]. La mutation des sous-unités du récepteur bloquant la liaison de l'IP<sub>3</sub> à son domaine n'empêche pas l'ouverture du canal [198]. Les IP<sub>3</sub>Rs sont exprimés sous trois isoformes (IP<sub>3</sub>R1, IP<sub>3</sub>R2 et IP<sub>3</sub>R3) ayant chacune une affinité distincte pour l'IP<sub>3</sub> et un assemblage qui peut être sous forme d'homo- ou d'hétérotétramères [201-203]. Il est généralement considéré qu'IP<sub>3</sub>R2 est plus sensible à l'IP<sub>3</sub> qu'IP<sub>3</sub>R1, mais tous deux sont beaucoup plus sensibles qu'IP<sub>3</sub>R3 [201, 202]. Toutefois, il est important de noter que le niveau d'expression, la distribution intracellulaire, les modifications post-traductionnelles et transcriptionnelles, ainsi que l'association des IP<sub>3</sub>Rs à des protéines accessoires peuvent être d'importants facteurs de leur sensibilité apparente à l'IP<sub>3</sub> (revue de la littérature [194]).

D'autre part, de nombreuses études d'électrophysiologie ont démontré que le Ca<sup>2+</sup> est essentiel pour moduler l'activité des IP<sub>3</sub>Rs (revue de la littérature [204]). Similairement aux RyRs des CMLVs, le [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> a un effet biphasique sur les IP<sub>3</sub>Rs [205, 206]. Des études de patch-clamp en configuration canal unitaire (*single-channel*) ainsi que des études mesurant l'efflux calcique ont montré que la courbe représentant la probabilité d'ouverture des IP<sub>3</sub>Rs en fonction de la concentration en Ca<sup>2+</sup> a l'allure d'une cloche, c'est-à-dire qu'elle est biphasique [207, 208]. Des concentrations modérées de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (< 1 μM) sensibilisent les IP<sub>3</sub>Rs pour leur ouverture, alors que des concentrations plus élevées (> 1 μM) les inhibent [201, 205]. Ce phénomène s'explique par la présence de deux sites de liaison au Ca<sup>2+</sup> sur les IP<sub>3</sub>Rs ayant des

affinités distinctes [209]. Le site de liaison de forte affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  engendre l'ouverture du canal, d'où le nom donné du site « activateur », alors que le site à faible affinité provoque sa fermeture, soit le site « inhibiteur ». Ainsi, une faible augmentation du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  favorise la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  au site de forte affinité, tandis qu'une augmentation plus élevée engendrera l'association du  $\text{Ca}^{2+}$  au site de faible affinité. L'activation par le  $\text{Ca}^{2+}$  varie également selon l'isoforme. À de faibles concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $< 100 \text{ nM}$ ),  $\text{IP}_3\text{R3}$  a une probabilité d'ouverture plus élevée qu' $\text{IP}_3\text{R1}$  [194]. La probabilité d'ouverture d' $\text{IP}_3\text{R3}$  augmente moins rapidement plus la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  augmente, alors qu' $\text{IP}_3\text{R1}$  devient de plus en plus sensible. Ainsi, la probabilité d'ouverture des  $\text{IP}_3\text{R3}$  augmente dans une gamme entre  $0.01 \mu\text{M}$  et  $1 \mu\text{M}$ , tandis que celle d' $\text{IP}_3\text{R1}$  ne survient qu'à partir de  $0.1 \mu\text{M}$  [194, 210]. Quant à l'impact physiologique associé à l'inhibition par le  $\text{Ca}^{2+}$  se percevrait au niveau de la propagation du signal calcique. Une faible affinité au  $\text{Ca}^{2+}$  du site inhibiteur empêcherait la propagation du signal calcique en inhibant les récepteurs localisés à proximité du signal calcique. À l'inverse, une forte affinité au  $\text{Ca}^{2+}$  du site inhibiteur favoriserait la propagation du signal calcique puisqu'elle limiterait l'ouverture des canaux qu'à de plus grandes distances [194]. Il est également intéressant de noter que l' $\text{IP}_3$ , favorisant l'ouverture des  $\text{IP}_3\text{Rs}$ , va également affecter l'affinité des récepteurs au  $\text{Ca}^{2+}$ , puisque des concentrations de plus en plus élevées d' $\text{IP}_3$  va graduellement diminuer l'inhibition des récepteurs par le  $\text{Ca}^{2+}$  [211, 212]. Un autre modèle appuie cette hypothèse en suggérant que l' $\text{IP}_3$  va non seulement lever l'inhibition par le  $\text{Ca}^{2+}$ , mais également favoriser la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  sur son site d'activation au niveau des  $\text{IP}_3\text{Rs}$  [194, 200]. Plusieurs études spéculent que l'inhibition par le  $\text{Ca}^{2+}$  se fait à l'aide d'une protéine accessoire qui serait la calmoduline, puisque les  $\text{IP}_3\text{Rs}$  sont inhibés par le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline [213, 214]. Néanmoins, la base moléculaire par laquelle la calmoduline inhibe les  $\text{IP}_3\text{Rs}$  n'a toujours pas été établie. Enfin, le niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  intra-luminal du RE semble aussi pouvoir moduler l'activation des  $\text{IP}_3\text{Rs}$  en modifiant la sensibilité du récepteur à l' $\text{IP}_3$  et au  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique [215, 216]. Toutefois, plusieurs études sur ce sujet se contredisent encore, d'où l'importance d'approfondir nos connaissances sur ce mécanisme.

Outre l' $\text{IP}_3$  et le  $\text{Ca}^{2+}$ , de nombreux éléments peuvent également moduler l'activité des  $\text{IP}_3\text{Rs}$ . Les  $\text{IP}_3\text{Rs}$  peuvent être phosphorylés par divers kinases telles que la PKA, la PKC et CaMKII,

modulant ainsi leur activation [217-219]. Néanmoins, le mécanisme de régulation le mieux caractérisé est celui par l'ATP qui favorise l'activation des récepteurs par le  $\text{Ca}^{2+}$  [207].

Pour résumer, l' $\text{IP}_3$  sensibilise les  $\text{IP}_3\text{Rs}$  au  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en favorisant la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  au site activateur des récepteurs ainsi qu'en libérant l'inhibition faite par le  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette inhibition par le  $\text{Ca}^{2+}$  semble jouer un rôle dans la propagation du signal calcique dans la cellule. De plus, des évidences suggèrent qu'elle implique une protéine accessoire : la calmoduline. Quant au  $\text{Ca}^{2+}$  intra-luminal du RE, il pourrait également sensibiliser les récepteurs à leurs ligands cytoplasmiques ( $\text{IP}_3$  et  $\text{Ca}^{2+}$ ). Ainsi, l' $\text{IP}_3$  et le  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique vont réguler les cinétiques d'activations des  $\text{IP}_3\text{Rs}$ .

### **Les canaux à potentiel de récepteur transitoire (TRPs)**

L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme se fait *via* les canaux TRPs endothéliaux. Il existe 26 membres dans la famille des canaux TRPs perméables mais non-sélectifs au  $\text{Ca}^{2+}$  dont plusieurs sont exprimés au niveau de l'endothélium vasculaire. L'ouverture des canaux TRPs peut être modulée par de nombreux stimuli physiques tels que la température, le flux sanguin, les contraintes de cisaillements et l'étirement cyclique ou encore les métabolites de l'acide arachidonique (EETs), l' $\text{IP}_3$ , le  $\text{Ca}^{2+}$ , la PKC, la PLC et le DAG [220]. Plusieurs études ont permis d'établir un rôle primordial des canaux TRPs dans la vasodilatation artérielle par leur implication dans la régulation du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  et du potentiel membranaire [48, 97, 99].

D'une part, il a été démontré que les canaux TRP sont impliqués dans l'influx calcique associé au mécanisme du SOCE (*Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry*) déclenché suite à une déplétion des réserves intracellulaires de  $\text{Ca}^{2+}$  (libéré par les  $\text{IP}_3\text{Rs}$ ) [192, 221]. Parmi les premières études, Freichel et coll. ont constaté une absence d'influx calcique associé au SOCE, ainsi qu'une diminution de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  en réponse à l'ACh dans les CEs isolées de souris  $\text{TRPC4}^{-/-}$  [221]. Par conséquent, en présence d'ACh, une diminution de la relaxation de sections d'anneaux aortiques de souris  $\text{TRPC4}^{-/-}$  a été observée. Depuis, de nombreuses études ont démontré l'implication de plusieurs autres membres de la famille des TRPs (TRPC3, TRPA1, TRPV3 et TRPV4) dans la vasodilatation artérielle [48, 97, 99, 222].

D'autre part, les canaux TRPV4 représentent une voie de signalisation calcique importante dans les CEs (section 2.3.2,  $\text{Ca}^{2+}$ -*sparklets*, page 54) [42]. D'abord, les canaux TRPV4 peuvent être activés par les EETs produits par l'endothélium afin d'engendrer une vasodilatation, ce qui est complètement abolie chez les souris TRPV4<sup>-/-</sup> [89, 96]. Parmi les nombreuses études de fonctions effectuées, il a été démontré que dans divers types de vaisseaux, un influx calcique généré par les TRPV4 est suffisant pour provoquer une dilatation en réponse au débit ou aux contraintes de cisaillements [223, 224]. De plus amples études ont montré que la dilatation induite par le flux sanguin est significativement altérée chez les souris TRPV4<sup>-/-</sup> ou suite à une inhibition des TRPV4 [223, 225].

Enfin, l'utilisation de modèles de souris *knock-out* a permis d'identifier de nombreux canaux TRPs perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  impliqués dans la fonction endothéliale. Brièvement, Kochukov et coll. ainsi que l'équipe de Sadow suggèrent que TRPC1 et TRPC3 respectivement, génèrent un influx calcique et sont impliqués dans la vasorelaxation [48, 226]. Dans une autre étude, l'équipe de Scott Earley a démontré que l'influx calcique généré par TRPA1 et TRPV3 provoque une dilatation des artères cérébrales [97, 227]. En résumé, il est évident que l'influx calcique dû à l'ouverture des canaux TRPs est primordial dans la régulation de diverses fonctions endothéliales et une altération de cette voie est associée à des pathologies telles que l'hypertension artérielle [228].

### **Le complexe ORAI1/STIM1**

Les CEs expriment également à leur membrane plasmique les canaux ORAI1 impliqués dans l'augmentation du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en réponse à une déplétion des réserves intracellulaires. Cette déplétion des réserves intracellulaires se produit en réponse à l'activation d'un récepteur par son agoniste ou suite à une inhibition des pompes SERCA, permettant la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$ . Ceci déclenche ensuite le mécanisme de SOCE qui débute par une oligomérisation de STIM1 à la membrane du RE suivie de son association au canal ORAI1 de la membrane plasmique [229]. STIM1 agit entre autres comme un détecteur du niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE grâce au motif de la main EF (*EF-hand motif*) [229]. La formation du complexe ORAI1/STIM1 va activer ORAI1, ce qui provoque un influx calcique vers le cytoplasme selon le gradient électrochimique du  $\text{Ca}^{2+}$  [230, 231]. Il a également été démontré que la  $\text{iPLA}_2$  indépendante

du  $\text{Ca}^{2+}$  contribue à l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par la voie du SOCE [232]. Un *knock-down* de la iPLA2, ainsi que de STIM1, provoque une altération de l'activation de la voie du SOCE dans divers types cellulaires [232]. Le ROCE (*Receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry*), un mécanisme similaire, consiste en une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  via les canaux ROC (*Receptor-operated channel*) en réponse à une hyperpolarisation induite par un agoniste [232, 233]. Ces deux mécanismes (SOCE et ROCE) génèrent un influx calcique permettant de maintenir le niveau de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  élevé suite à une déplétion des réserves intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  ou en réponse à une hyperpolarisation de la membrane des CEs induite par un agoniste. Dans les CEs, les canaux impliqués dans les mécanismes de SOCE et de ROCE incluent respectivement le complexe ORAI1/STIM1 ainsi que les canaux TRPs, [230, 231, 234, 235].

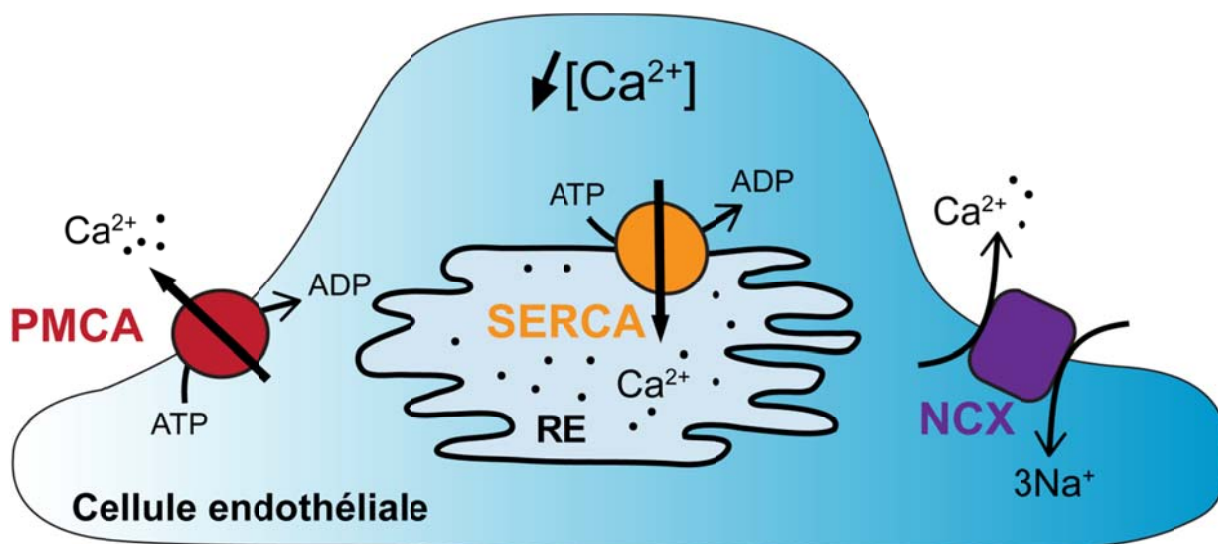
## **2.2.2 Les mécanismes d'évacuation du $\text{Ca}^{2+}$ libre intracellulaire**

L'homéostasie calcique endothéliale est un équilibre entre la libération ou l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  vers le cytoplasme et son évacuation vers les réserves intracellulaires (RE, mitochondrie) ou le milieu extracellulaire. La recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  vers les réserves intracellulaires requiert la présence des pompes ATPase SERCA au niveau de la membrane du RE, alors que l'expulsion du  $\text{Ca}^{2+}$  vers le milieu extracellulaire nécessite les pompes PMCA et les échangeurs NCX (Figure 12, page 39).

### **Les pompes ATPase du réticulum endoplasmique (SERCA)**

La recapture du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  vers le RE se fait presque exclusivement par les pompes SERCA afin de diminuer le niveau de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  et ainsi éviter une cytotoxicité dans les CEs. Certaines études suggèrent que les pompes SERCA se retrouvent également au niveau de l'appareil de Golgi ainsi que dans des compartiments tels que les cavéolae [236, 237]. La pompe permet de transporter deux ions de  $\text{Ca}^{2+}$  contre son gradient de concentration en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse d'un ATP. Cette réaction provoque un changement de conformation de la protéine transmembranaire permettant le transfert du  $\text{Ca}^{2+}$  vers l'espace luminal du RE [238]. Ce transport actif génère donc un gradient de  $\text{Ca}^{2+}$  entre l'espace intra-luminal du RE et le cytoplasme. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de SERCA tels que la

thapsigargine, l'acide cyclopiazonique (CPA) et le dibenzohydroquinone, permet d'étudier de diverses manières les dynamiques calciques endothéliales.



**Figure 12. Voies de signalisations impliquées dans l'évacuation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire**

Le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est expulsé vers le milieu extracellulaire via les pompes PMCA et les échangeurs NCX de la membrane plasmique, alors que la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  vers les réserves intracellulaires se fait principalement via les pompes SERCA du réticulum endoplasmique.

ATP : adénosine triphosphate, ADP : adénosine diphosphate,  $\text{Ca}^{2+}$  : calcium,  $\text{Na}^+$  : sodium, NCX: échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , PMCA: pompe ATPase de la membrane plasmique, SERCA : pompe ATPase du réticulum endoplasmique.

Dans l'endothélium vasculaire, SERCA est exprimée sous deux isoformes : SERCA2 qui est ubiquitaire et SERCA3 [238]. SERCA2 est essentiellement régulée par le phospholamban (PLB), qui agit comme un inhibiteur lorsqu'il est non-phosphorylé, alors que sa phosphorylation relève l'inhibition [239]. Le PLB diminue l'affinité au  $\text{Ca}^{2+}$  de la pompe et par conséquent inhibe l'activité de SERCA2 sans affecter les cinétiques d'activations (par exemple, la liaison et hydrolyse de l'ATP) [238]. Les protéines pouvant phosphoryler le PLB incluent la CaMKII sensible au  $\text{Ca}^{2+}$  et la PKA [240]. En revanche, SERCA3 ne possède pas le domaine de liaison pour le PLB et son affinité au  $\text{Ca}^{2+}$  est plus faible que l'isoforme 2 [238]. Des études sur des souris  $\text{SERCA3}^{-/-}$  et  $\text{PLB}^{-/-}$  ont montré une altération de la relaxation endothélium-dépendante de l'aorte en réponse à l'ACh [241, 242]. Il est donc évident que les pompes SERCA sont essentielles pour le maintien de l'homéostasie calcique endothéliale.

## Les pompes ATPase de la membrane plasmique (PMCA)

Les pompes PMCA présentes à la membrane plasmique sont importantes pour finement moduler l'homéostasie calcique endothéliale. Elles permettent l'expulsion du  $[Ca^{2+}]_i$  vers le milieu extracellulaire. Ces pompes ont une très grande affinité pour le  $Ca^{2+}$ , mais leur taux d'expulsion d'un ion de  $Ca^{2+}$  au détriment d'un ATP est plutôt lent [243]. Parmi les nombreux mécanismes régulateurs de la pompe, la liaison de la calmoduline à son domaine est le mieux établi (revue de la littérature [244]). La liaison de la calmoduline à son domaine libère l'auto-inhibition induite par la liaison de ce domaine à l'extrémité C-terminale de la pompe [243, 245]. Dans les CEs, les PMCA sont exprimées sous trois isoformes : principalement PMCA1, ainsi que PMCA2 et 4 [246, 247]. Les différences entre les isoformes varient selon les exigences du type cellulaire qui les expriment. PMCA1 et 4 sont reconnues pour avoir un taux d'expulsion plus lent, alors que PMCA2 et 3 sont plus rapides, ce qui est une caractéristique importante dans l'homéostasie calcique [243, 247].

L'étude des PMCA se fait principalement à l'aide de modèles animaux  $PMCA^{-/-}$ , mais aussi à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques contre les ATPases soit l'éosine, le vanadate et plus spécifiquement le caloxine [244, 248-250]. De nombreuses études ont démontré que les phospholipides ainsi que les PKA et PKC peuvent réguler l'activité des pompes [243, 249]. La présence de plusieurs sites de liaisons pour diverses protéines sur l'extrémité C-terminale indique que les PMCA peuvent non seulement être régulées par plusieurs protéines, mais pourraient également être impliquées dans des voies spécifiques de signalisations sensibles au  $Ca^{2+}$  [243, 244, 249]. Ainsi, outre leur rôle d'expulser le  $[Ca^{2+}]_i$ , les PMCA sont impliquées dans la fonction endothéliale comme un modulateur d'enzymes dépendantes du complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline. En effet, l'interaction directe de NOS3 aux PMCA inhibe la production de NO [246]. L'inhibition de la pompe va engendrer une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$ , qui semble augmenter la production de NO *via* la NOS3 dépendante du  $Ca^{2+}$  [246]. Finalement, des évidences suggèrent que les PMCA seraient impliquées dans diverses maladies cardiovasculaires telles que l'insuffisance cardiaque, l'hypertension et le diabète [243, 245, 251].



## Les échangeurs sodium/calcium (NCX)

Les échangeurs NCX présents au niveau de la membrane plasmique des CEs vont expulser le  $[Ca^{2+}]_i$  vers le milieu extracellulaire en échange d'une entrée de  $Na^+$  ( $3 Na^+ : 1 Ca^{2+}$ ) [252, 253]. La présence de NCX a également été démontrée au niveau de la membrane des mitochondries (section 2.2.3, la mitochondrie), ainsi que celle des cavéolae [254, 255]. Dans les CEs, l'isoforme principalement exprimée est le NCX1 [256]. Parmi les mécanismes régulateurs de NCX, la phosphorylation du phospholemman inhibe les échangeurs [257-259]. Toutefois, dans l'endothélium le phospholemman ne semble pas être exprimé [247, 256]. Contrairement aux PMCA, les échangeurs ont une faible affinité pour le  $Ca^{2+}$ , suggérant un rôle important dans l'homéostasie calcique lors d'une forte augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  [252, 260]. Certains suggèrent que les NCX peuvent aussi travailler en mode inverse afin de permettre l'entrée de  $Ca^{2+}$ , dépendamment des gradients électrochimiques du  $Na^+$  et du  $Ca^{2+}$ . Par exemple, dans les CMLVs les NCX en mode inverse joueraient un rôle dans le remplissage du SR. De plus, en changeant le gradient du  $Na^+$ , à l'aide de l'ionophore monensine, la relaxation endothélium-dépendante des artères est significativement diminuée, suggérant qu'en mode inverse les NCX participent à l'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  en réponse à une stimulation par un agoniste endothélial [131, 256, 261, 262]. Une interaction fonctionnelle entre NCX et NOS3, entre autres dans les cavéolae, suggère que les NCX en mode inverse seraient également impliqués dans la régulation de l'activité de NOS3 et ainsi, dans la stimulation de la production de NO [254]. Néanmoins, plusieurs évidences stipulent que les NCX sont impliqués dans diverses pathologies impliquant un surplus de  $[Ca^{2+}]_i$  [263-265].

### 2.2.3 La mitochondrie

Similairement au RE, la mitochondrie comptant environ 25% de la réserve intracellulaire en  $Ca^{2+}$  joue un rôle primordial dans la régulation du  $[Ca^{2+}]_i$  [192]. La mitochondrie permet l'entrée de  $Ca^{2+}$  vers la matrice mitochondriale *via* les uniporteurs calciques (mCU; *mitochondrial  $Ca^{2+}$  uniporter*), alors que la sortie de  $Ca^{2+}$  vers le milieu intracellulaire se fait à l'aide de pores de transitions de perméabilité mitochondriale (mPTP) et d'échangeurs  $Na^+/Ca^{2+}$  (mNCX) [255].

Le  $\text{Ca}^{2+}$  est essentiel à la régulation de l'activité mitochondriale telle que la production d'ATP et plus précisément la modulation d'enzymes de la phosphorylation oxydative (NADH déshydrogénase, succinate déshydrogénase et ATP synthase) [266, 267]. Le passage du  $\text{Ca}^{2+}$  vers la matrice mitochondriale se fait selon le gradient électrochimique par l'uniporteur mCU présent au niveau de la membrane interne de la mitochondrie [268, 269]. Cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  est associée aux canaux anioniques voltage-dépendants (VDAC) de la membrane externe qui permet d'abord l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu intracellulaire vers l'espace intermembranaire de la mitochondrie [269-271]. L'affinité des mCU pour le  $\text{Ca}^{2+}$  est plus importante lorsqu'une augmentation locale de  $\text{Ca}^{2+}$  parvient à proximité des uniporteurs, contrairement à une augmentation globale. En effet, de nombreuses évidences suggèrent que la mitochondrie est sensible à une augmentation locale de  $\text{Ca}^{2+}$  générée par l'ouverture des  $\text{IP}_3\text{Rs}$  environnant [272, 273]. Des techniques en tomographie et des études en microscopie électronique ont montré des régions où la mitochondrie et le RE sont séparés d'uniquement 10-25 nm, permettant un contact entre les protéines membranaires [272, 274, 275].

D'autre part, les mitochondries vont libérer leur contenu en  $\text{Ca}^{2+}$  *via* les mPTP sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  et les échangeurs NCX et HCX ( $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ ) [255]. Les mPTP s'ouvrent suite à une surcharge de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la matrice et libère entre autres le  $\text{Ca}^{2+}$  et plusieurs autres substances telles que des nucléotides (ATP) [276, 277]. Enfin, les échangeurs NCX semblent avoir un rôle moins prédominant dans les CEs contrairement aux cellules excitables telles que les cardiomyocytes [269]. La libération du  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , ainsi que d'autres petits ions et molécules) en réponse à un changement de la perméabilité de la membrane interne des mitochondries est induite par une forte concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la matrice mitochondriale [278].

La mitochondrie semble être impliquée dans la signalisation calcique cytoplasmique de différents types cellulaires (CEs, cellules pancréatiques acineuses, astrocytes corticales de rat) en prévenant par exemple la propagation des vagues calciques [279-281]. Une relation de proximité a été établie entre les mitochondries et le RE, suggérant un rôle de tampon calcique aux mitochondries [282]. Dans les CEs, il a été démontré que le  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial augmente suite à une libération de  $\text{Ca}^{2+}$  provenant du RE [283, 284]. D'autre part, il a été suggéré que dans les CEs le  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial peut moduler la production de NO [285]. D'ailleurs, le NO

a la capacité d'inhiber la chaîne respiratoire et de diminuer le potentiel membranaire de la mitochondrie dans les CEs d'artères pulmonaires de veau en culture [286]. Un mécanisme de rétroaction négatif a été suggéré lorsque qu'une équipe a démontré qu'une isoforme de la NOS sensible au  $\text{Ca}^{2+}$  est localisée au niveau de la mitochondrie [287]. Ainsi, une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial stimule la production de NO afin de diminuer le potentiel membranaire et par conséquent la surcharge de  $\text{Ca}^{2+}$ . De nombreuses études ont montré qu'une altération de l'homéostasie calcique mitochondriale engendre des dommages au niveau de la structure et de la fonction mitochondriale pouvant mener la cellule à l'apoptose [288]. Une accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la matrice mitochondriale est associée à des conditions de stress oxydatif et une mort cellulaire subséquente [288, 289].

En résumé, l'homéostasie calcique endothéliale est régie par plusieurs protéines permettant la libération du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  provenant du RE ainsi que l'entrée et la sortie du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  vers le milieu extracellulaire. L'activation des  $\text{IP}_3\text{Rs}$  du RE et des canaux TRPs et ORA1 de la membrane plasmique engendre une augmentation du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . À l'opposé, les pompes SERCA et PMCA, ainsi que les échangeurs NCX, diminuent le  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en expulsant le  $\text{Ca}^{2+}$  vers les réserves intracellulaires ou le milieu extracellulaire. Ces protéines sont donc les composantes essentielles des différentes signalisations calciques endothéliales. La mitochondrie participe donc à l'homéostasie calcique et la fonction endothéliale en intervenant dans les dynamiques calciques.

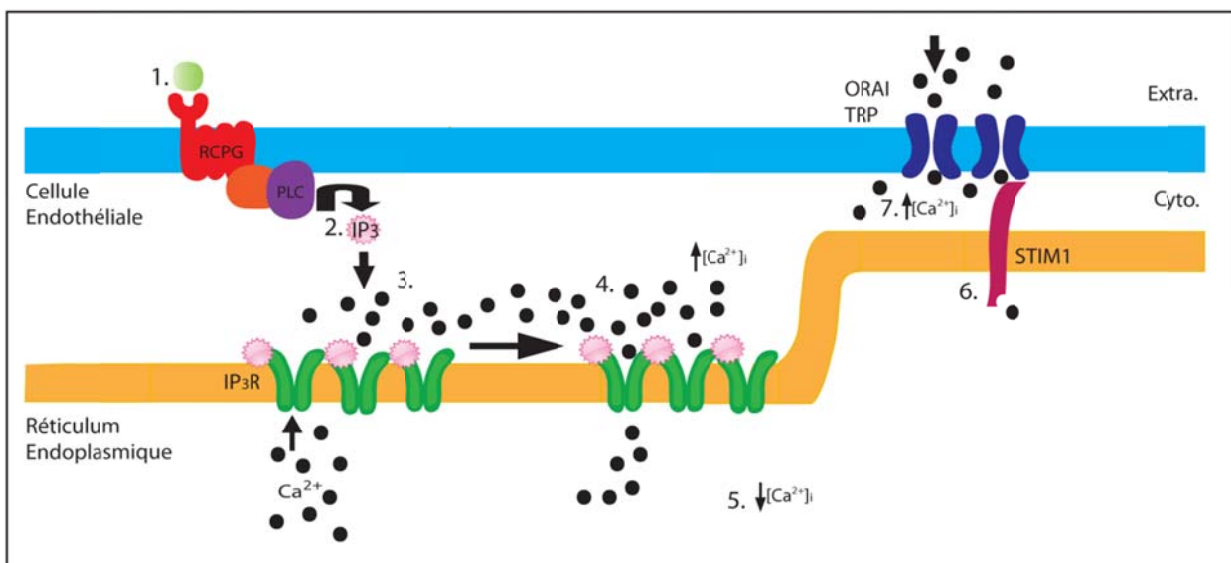
## 2.3 Les dynamiques calciques endothéliales

Le  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , primordial pour les diverses fonctions endothéliales, est présenté selon différents types de signaux appelés dynamiques calciques. Ces dynamiques calciques endothéliales sont divisées en deux catégories : les variations globales et les variations locales du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Elles se distinguent principalement par la dispersion et la durée du signal calcique engendré. Les dynamiques calciques « globales » vont générer d'importantes variations cytoplasmiques du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  souvent reconnues sous la forme de vagues calciques. Tandis que les dynamiques calciques « locales » consistent plutôt en une propagation spatiale restreinte prenant la forme de  *$\text{Ca}^{2+}$  blips, puffs, wavelets, sparklets* ou encore pulsars calciques. La signalisation calcique globale se différencie par l'origine de son stimulus qui est généralement induit par un agoniste

tel que l'ACh ou la Bk ou par un stimulus mécanique (contraintes de cisaillement, flux sanguin), alors que la signalisation locale peut être induite de façon spontanée. Il est important de noter que des agonistes peuvent également moduler les dynamiques calciques locales. Sachant que l'homéostasie calcique est primordiale pour les différentes fonctions endothéliales, de nombreuses études tentent d'identifier les rôles physiologiques de ces dynamiques calciques ainsi que leurs mécanismes régulateurs. Plusieurs pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle, les accidents vasculaires cérébraux (AVCs), le diabète et l'athérosclérose sont associées à une dysfonction endothéliale liée à une perturbation de l'homéostasie calcique [131, 192, 290-292]. En conséquence, plusieurs études impliquant de nouvelles technologies ont permis un progrès important des connaissances des dynamiques calciques endothéliales. D'ailleurs, diverses études ont clairement établi une relation directe entre les dynamiques calciques globales et les pathologies vasculaires. Par contre, outre les travaux récents de Sonkusare et coll. effectués dans un modèle animal d'hypertension artérielle, la présence d'un lien entre les signalisations calciques locales et les différentes pathologies vasculaires reste à déterminer [228]. Des travaux suggèrent que ces types de signaux sont impliqués dans la fonction endothéliale. Il est donc important de caractériser les différents types de signalisations calciques endothéliales afin de comprendre leurs implications tant au niveau physiologique que pathologique.

### **2.3.1 La signalisation calcique globale**

L'homéostasie calcique globale est primordiale pour de nombreuses fonctions endothéliales impliquées dans divers processus physiopathologiques [293, 294]. Le  $[Ca^{2+}]_i$  global doit être finement régulé afin d'éviter le risque d'une toxicité cellulaire induite par une surcharge de  $[Ca^{2+}]_i$ . La signalisation calcique globale se caractérise généralement par une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  en réponse à l'activation de GPCRs par divers agonistes endothéliaux (ACh, Bk, ATP, AngII, insuline, etc.) ou de récepteurs TKRs présents à la membrane plasmique des CE (Figure 13, page 45) [50, 184, 295]. Un stimulus mécanique tels que les contraintes de cisaillements générées par le flux sanguin ou encore le stress oxydant sont également impliqués dans l'augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  global [189, 296, 297].



**Figure 13. Signalisation calcique globale de l'endothélium vasculaire.**

Une augmentation globale de  $[Ca^{2+}]_i$  est déclenchée par la stimulation d'un récepteur couplé à la protéine G (1), activant la voie de la PLC, qui engendre la production d'IP<sub>3</sub> (2). L'IP<sub>3</sub> se lie ensuite aux IP<sub>3</sub>R, stimulant la libération du Ca<sup>2+</sup> du réticulum endoplasmique (3). La libération du Ca<sup>2+</sup> par quelques récepteurs active d'autres récepteurs adjacents, générant ainsi les vagues calciques (4). Suite à la déplétion du réticulum endoplasmique (5), un changement de conformation de STIM1 (6) engendre la formation d'un complexe avec ORAI1 de la membrane plasmique et l'activation des canaux TRPs, afin de générer une augmentation globale de  $[Ca^{2+}]_i$  (7).  
 Ca<sup>2+</sup>: Calcium, Cyto.: Milieu cytoplasmique, Extra.: Milieu extracellulaire, IP<sub>3</sub> : Inositol 1,4,5-triphosphate, IP<sub>3</sub>R : Récepteurs à l'IP<sub>3</sub>, PLC : Phospholipase C, RCPG : Récepteur couplé aux protéines G. D'après Charbel et coll. 2013 [298].

L'élévation de Ca<sup>2+</sup> présente une forme biphasique débutant par une libération de Ca<sup>2+</sup> rapide et transitoire des réserves intracellulaires provenant essentiellement du RE. Cette augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  est ensuite soutenue par une entrée de Ca<sup>2+</sup> du milieu extracellulaire [299]. Généralement, la liaison d'agonistes endothéliaux aux GPCRs (ou TKRs) induit d'abord la formation d'IP<sub>3</sub> suite à l'activation de la PLC et active rapidement les IP<sub>3</sub>R du RE, provoquant ainsi le processus de « *Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release* » (CICR) [195, 196, 299]. Le mécanisme d'activation des IP<sub>3</sub>R dépend entre autre de la concentration d'IP<sub>3</sub> cytoplasmique, mais également du Ca<sup>2+</sup> environnant les récepteurs. Une libération de Ca<sup>2+</sup> locale de quelques IP<sub>3</sub>R activera les IP<sub>3</sub>R adjacents générant ainsi l'activation successive de IP<sub>3</sub>R, qui déclenche la « vague calcique » [300]. Cette libération de Ca<sup>2+</sup> résulte ultimement en une déplétion des réserves intracellulaires en Ca<sup>2+</sup> qui déclenche le mécanisme du SOCE. Le mécanisme du SOCE permet de maintenir l'augmentation globale en  $[Ca^{2+}]_i$  de la phase

initiale [143, 187]. Ce processus constitue la seconde phase de la signalisation calcique globale en engendrant un influx soutenu en  $\text{Ca}^{2+}$  provenant du milieu extracellulaire. L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  se fait par la combinaison des canaux membranaires TRPs et ORAI1, ainsi que STIM1 au niveau du RE [221, 230, 231, 235]. Toutefois, le mécanisme de SOCE n'est pas complètement établi voire même controversé, puisqu'il est généralement observé en condition expérimentale [301]. Le mécanisme du SOCE est également présent dans les CMLVs, toutefois l'entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$  provenant du milieu extracellulaire se fait principalement par les canaux VDCC, qui ne sont pas exprimés dans les CEs.

Un changement global du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans les CEs active divers mécanismes physiologiques permettant un contrôle assidu du tonus vasculaire. Précédemment, nous avons discuté de l'importance du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la synthèse et la libération de divers facteurs endothéliaux. Au niveau de la signalisation calcique, il a été démontré qu'une hausse globale du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  active la NOS3 ce qui stimule la production de NO, occasionnant une dilatation des vaisseaux sanguins [302, 303]. D'autre part, les mécanismes sous-jacents l'EDHF sont également sensibles au  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . L'activation des canaux potassiques  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  et  $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$  est sensible à l'augmentation globale du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [178, 180, 304, 305]. De plus, la synthèse des EETs, un important médiateur de l'EDHF, répond également à une signalisation calcique globale [95, 306]. La production de  $\text{PGI}_2$ , un autre composé vasodilatateur, est aussi tributaire du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  étant donné que son précurseur, l'acide arachidonique présent dans la membrane plasmique, est généré à l'aide de la  $\text{PLA}_2$  dépendante du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [171, 173]. Enfin, une variation globale du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  va affecter l'ensemble des mécanismes endothéliaux, alors que la signalisation calcique locale cible spécifiquement ces effecteurs afin de générer une réponse physiologique.

### **2.3.2 La signalisation calcique locale**

Des progrès importants au niveau des techniques d'imageries calciques ont amélioré nos capacités à identifier et spécifiquement localiser différentes signalisations calciques endothéliales spatialement et temporellement restreintes. Bien que la corrélation entre une variation globale du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  et les différentes fonctions endothéliales soit bien établie, peu d'informations démontrent celle d'une implication directe d'une variation locale du  $\text{Ca}^{2+}$ . Récemment, plusieurs études ont tenté de démontrer l'implication importante des

signalisations calciques locales sur la fonction endothéliale [307, 308]. Ce type de signal oscillatoire se caractérise par une augmentation spontanée et transitoire du  $[Ca^{2+}]_i$  dont la dispersion est restreinte. Ainsi, une faible propagation du signal, conjointement à une localisation intracellulaire définie et précise, procure à ce type de signalisation la capacité de moduler spécifiquement ces effecteurs. La restriction spatiale du signal calcique permet de cibler les protéines impliquées dans les différents mécanismes cellulaires, ce qui mènera à finement moduler les fonctions endothéliales. D'un autre côté, une augmentation locale du  $[Ca^{2+}]_i$  n'affectera pas l'ensemble des mécanismes sensibles au  $Ca^{2+}$  à travers la cellule. Ainsi, les dynamiques calciques locales vont spécifiquement réguler les fonctions endothéliales en acquérant un avantage énergétique considérable puisque moins de protéines et d'ions sont recrutés pour générer la réponse cellulaire désirée. Les différents types d'évènements calciques locaux se distinguent entre autres par leurs amplitudes, leurs durées ainsi que leur localisation intracellulaire particulière, mais également varient selon le type cellulaire (Tableau I, page 47). Diverses études ont d'abord permis la caractérisation des «  $Ca^{2+}$  blips » et «  $Ca^{2+}$  puffs », pour ensuite identifier les pulsars calciques, les «  $Ca^{2+}$  wavelets » et les «  $Ca^{2+}$  sparklets » dans les CEs [19, 29, 42, 309]. Les  $Ca^{2+}$ -wavelets et les  $Ca^{2+}$ -sparklets ont été caractérisés suite à l'identification des pulsars calciques [19].

	Durée (s)	Surface ( $\mu m^2$ )	Amplitude ( $F/F_0$ )
$Ca^{2+}$ blips[309]	0,100	1-3 $\mu m$	0,3
$Ca^{2+}$ puffs[310]	1,00	2-4	50-500 (nM)
Wavelets[29]	0,48	51,61	-
Sparklets[42]	0,037	11,2	0,19-0,29
Pulsars calciques[19]	0,257	15,9	1,77

**Tableau I. Caractéristiques des différentes signalisations calciques locales.**

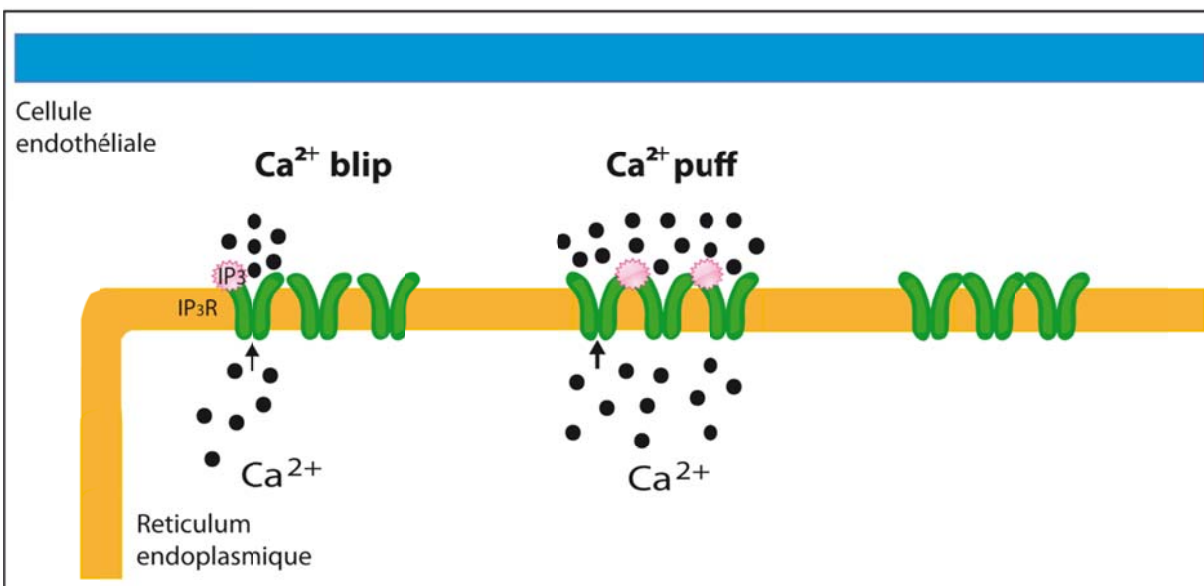
Les données sur les différentes caractéristiques des signalisations calciques locales proviennent respectivement de cellules endothéliales en culture ( $Ca^{2+}$  blips), des oocytes de *Xenopus* ( $Ca^{2+}$  puffs), des cellules endothéliales d'artères de muscle squelettique de rat (wavelets), des cellules endothéliales d'artères mésentériques de souris (sparklets et pulsars calciques).

## Les « $\text{Ca}^{2+}$ blips » et « $\text{Ca}^{2+}$ puffs »

Les premières études sur les dynamiques calciques locales ont été réalisées dans les ovocytes de *Xenopus* en 1991 par Parker & Yao, découvrant la présence des «  $\text{Ca}^{2+}$  blips » et «  $\text{Ca}^{2+}$  puffs » [311, 312]. Ce type de signalisation calcique locale se caractérise par une libération stochastique du  $\text{Ca}^{2+}$  via les  $\text{IP}_3$ R et représente souvent la phase initiale d'une vague calcique tel que décrit précédemment (Figure 14, page 49). L'intensité entre les différents signaux varie selon la concentration cytoplasmique d' $\text{IP}_3$ , d'où l'apparition de la vague calcique suite au recrutement de plusieurs de ces événements [307, 313]. D'abord, l'apparition spontanée de  $\text{Ca}^{2+}$  blips fait suite à l'ouverture d'un seul  $\text{IP}_3$ R en présence de faibles concentrations d' $\text{IP}_3$  [308, 310, 313]. Cet événement ne dure qu'environ 100 msec et une faible amplitude, d'environ 23 nM dans les CEs en culture d'artères pulmonaires bovines [309]. Ces  $\text{Ca}^{2+}$  blips sont observés dans plusieurs lits vasculaires, mais leur présence pourrait probablement être rapportée dans tous les types d'endothélium [314, 315]. Une concentration cytoplasmique plus élevée d' $\text{IP}_3$  ou de  $\text{Ca}^{2+}$  libre engendre le recrutement de plusieurs  $\text{IP}_3$ Rs en amas provoquant ainsi les  $\text{Ca}^{2+}$  puffs sans générer de vagues calciques [309, 310, 316]. Dans d'autres types cellulaires tels que les cardiomyocytes ou encore les CMLVs, les  $\text{Ca}^{2+}$  puffs sont analogues aux «  $\text{Ca}^{2+}$  sparks » qui eux sont générés par une libération de  $\text{Ca}^{2+}$  via les RyRs du RE [26]. Les  $\text{Ca}^{2+}$  puffs sont définis par un signal calcique d'une durée  $\leq 1$  sec et dont l'amplitude est largement supérieure aux  $\text{Ca}^{2+}$  blips, soit de 50 à 100 nM [309, 310]. La combinaison de ces événements accompagnée d'une augmentation de la densité des  $\text{IP}_3$ Rs peut déclencher une propagation du signal calcique à travers la cellule, générant ainsi les vagues calciques [313, 316]. Ces événements transitoires sont sensibles au niveau d' $\text{IP}_3$  cytoplasmique. Par conséquent, ils peuvent être régulés par l'activation de GPCRs et ainsi, participer au phénomène de CICR [204]. Les études pionnières sur les  $\text{Ca}^{2+}$  blips et  $\text{Ca}^{2+}$  puffs se sont principalement concentrées sur l'aspect hiérarchique de ces événements à initier un changement global du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Toutefois, l'intérêt croissant sur la compréhension de ces dynamiques a permis de découvrir l'implication importante de ces signaux dans les divers processus physiologiques. Les  $\text{Ca}^{2+}$  blips et les  $\text{Ca}^{2+}$  puffs possèdent un rôle important dans le phénomène d'exocytose ou encore dans l'activation de canaux ioniques [307, 308, 317]. Contrairement à une variation globale du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, une dispersion spatiale



restreinte du signal calcique telle qu'observée dans ces événements permet de cibler les protéines importantes pour la régulation de multiples processus cellulaires sans affecter l'ensemble des mécanismes endothéliaux sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces événements circonscrits et aléatoires ont suscité un grand intérêt quant à l'étude des dynamiques calciques endothéliales.



**Figure 14. Les " $\text{Ca}^{2+}$  blips" et les " $\text{Ca}^{2+}$  puffs" de l'endothélium vasculaire.**

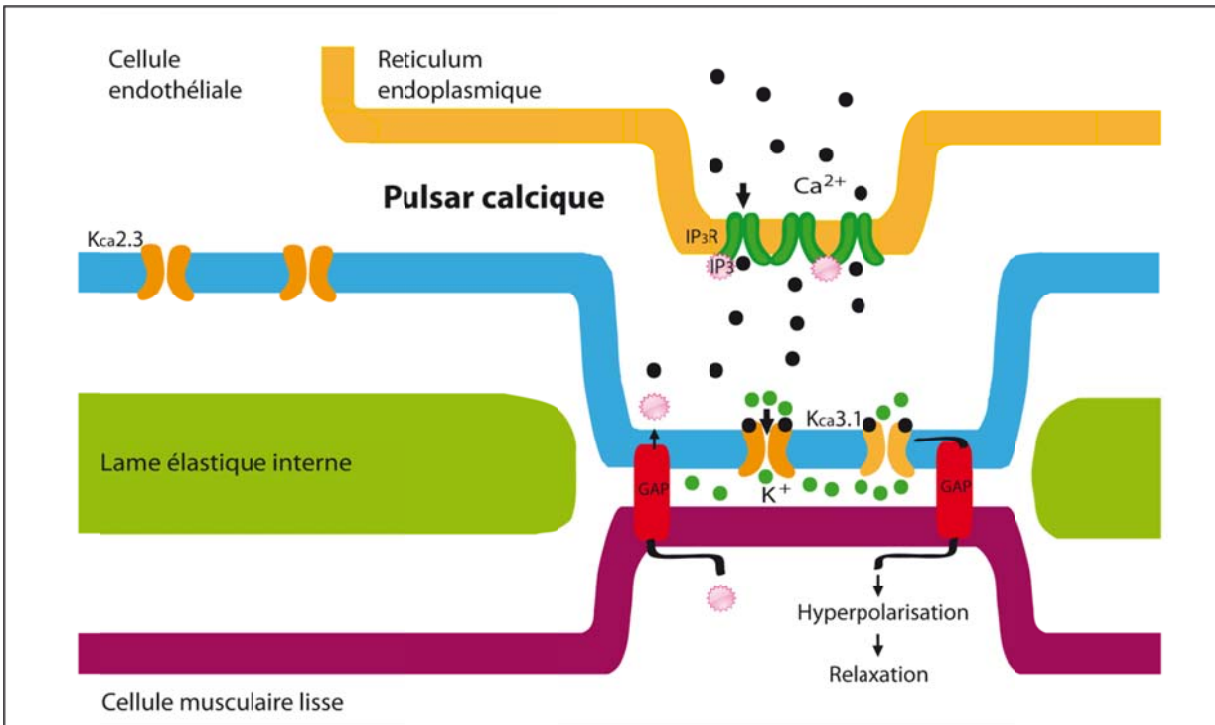
L'activation d'un seul  $\text{IP}_3\text{R}$  provoque les  $\text{Ca}^{2+}$  blips, alors que de plus forte concentration intracellulaire d' $\text{IP}_3$ , l'activation de plusieurs  $\text{IP}_3\text{R}$  adjacents engendre les  $\text{Ca}^{2+}$  puffs.  $\text{Ca}^{2+}$ : Calcium,  $\text{IP}_3$  : Inositol 1,4,5-triphosphate,  $\text{IP}_3\text{Rs}$  : Récepteurs à l' $\text{IP}_3$ . D'après Charbel et coll. 2013 [298].

### Les pulsars calciques

Historiquement, le pulsar calcique est le premier signal identifié présentant une localisation intracellulaire spécifique restreinte dans les PME d'artères de résistance. Ledoux et coll. ont démontré pour la toute première fois l'évidence d'un signal calcique structuré et répétitif avec une localisation intracellulaire endothéliale particulière (Figure 15, page 51) [19]. Ce type de signal survient suite à l'activation spontanée et aléatoire des  $\text{IP}_3\text{Rs}$  au niveau des PME. Des expériences d'immunofluorescence sur des artères intactes de souris ont permis de montrer la présence de  $\text{IP}_3\text{Rs}$  dans les perforations de la IEL, soit dans les PME [19]. Un signal calcique restreint au niveau de PME est propice aux échanges entre les CE et CMLVs, suggérant un rôle dans la régulation du tonus vasculaire. Les propriétés spatiotemporelles des pulsars diffèrent évidemment des autres signalisations calciques locales. Les cinétiques et fréquences

des pulsars sont abolies suite à l'inhibition des IP<sub>3</sub>Rs (xestospongine C), de la PLC (U73122) ou des pompes SERCA (CPA) [19]. De plus, en absence d'agonistes, l'effet d'une inhibition de la PLC indique que les pulsars calciques sont stimulés par un taux basal d'IP<sub>3</sub>. À l'opposé, une augmentation d'IP<sub>3</sub> cytoplasmique suite à une stimulation à l'ACh augmente la fréquence des pulsars calciques, mais également des vagues calciques et du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> global. La localisation intracellulaire spécifique spatialement restreinte des pulsars calciques permet de moduler finement les voies de signalisation sensibles au Ca<sup>2+</sup> dans ces régions, sans toutefois affecter les fonctions cellulaires plus globales telles que la régulation génique. Ledoux et coll. suggèrent que les pulsars ont un rôle influent dans le contrôle du tonus vasculaire par l'activation de cibles sensibles au Ca<sup>2+</sup> présents dans les PME [19]. En effet, les canaux potassiques K<sub>Ca</sub>3.1 identifiés au niveau des PME sont activés par les pulsars. Cette activation résulte en une hyperpolarisation de la membrane plasmique endothéliale qui est transmise aux CMLVs *via* les jonctions Gap ou par la production d'un nuage potassique dans l'espace myoendothélial qui active les canaux K<sub>ir</sub> à la membrane des CMLVs [19, 36]. En activant les canaux potassiques K<sub>Ca</sub>3.1, les pulsars pourraient être impliqués dans le mécanisme de l'EDHF et par conséquent jouer un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire.

Malgré que les dynamiques calciques locales aient récemment suscité beaucoup d'intérêts, très peu d'informations sont connues sur leurs mécanismes régulateurs ainsi que sur leurs cibles éventuelles. Outre leur impact sur l'hyperpolarisation de la membrane plasmique endothéliale, la caractérisation de rôles physiopathologiques reste à déterminer. Les canaux potassiques K<sub>Ca</sub>3.1 ont jusqu'à présent été la seule cible identifiée des pulsars. Néanmoins, de nombreuses autres protéines sensibles au Ca<sup>2+</sup> pourraient être localisées au niveau des PME et ainsi être des cibles potentielles pour les pulsars calciques. Des évidences ont montré entre autres la présence de la NOS3 dépendante du Ca<sup>2+</sup> dans les PME. Il est également intéressant de noter que CaMKII a la capacité unique de décoder les différentes oscillations calciques intracellulaires similaires aux pulsars calciques [318]. Par conséquent, cette enzyme pourrait être un important effecteur des pulsars calciques.



**Figure 15. Les pulsars calciques de l'endothélium vasculaire.**

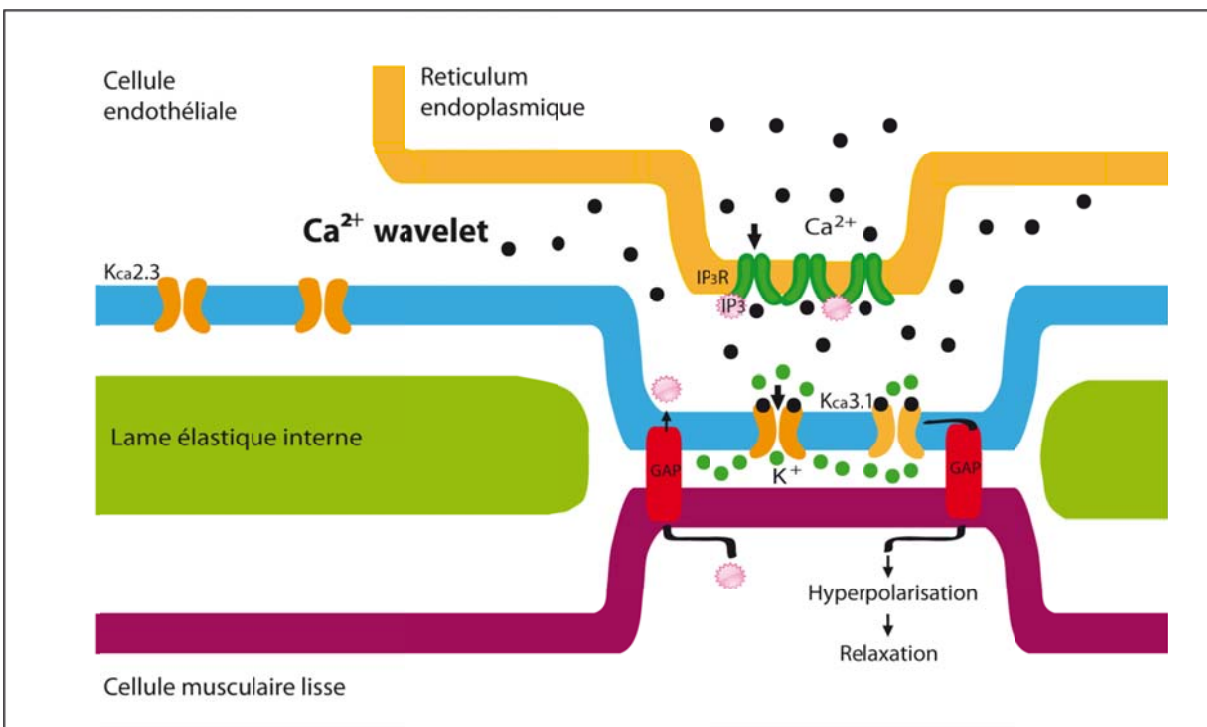
Les pulsars calciques sont une libération du  $\text{Ca}^{2+}$  par les  $\text{IP}_3\text{Rs}$  du réticulum endoplasmique dans les projections myoendothéliales. Les pulsars calciques semblent être impliqués dans de spécifiques voies de signalisations pouvant moduler le tonus vasculaire. L'activation des canaux  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  par les pulsars calciques génère une hyperpolarisation des CEs transmise aux CMLVs, afin de provoquer une vasodilatation.

$\text{Ca}^{2+}$ : Calcium,  $\text{IP}_3$ : Inositol 1,4,5-triphosphate,  $\text{IP}_3\text{Rs}$ : Récepteurs à l' $\text{IP}_3$ ,  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ : canaux potassiques de moyenne conductance activés par le  $\text{Ca}^{2+}$ . Adaptée de Charbel et coll. 2013 [298].

### Les « $\text{Ca}^{2+}$ wavelets »

Tran et coll. se sont particulièrement intéressés au mécanisme de rétroaction myoendothéliale qui a mené à l'identification des «  $\text{Ca}^{2+}$  wavelets », définis comme étant des vagues calciques interrompues (Figure 16, page 52) [29]. Similairement aux  $\text{Ca}^{2+}$  blips et puffs, ainsi que les pulsars calciques, les wavelets sont déclenchés suite à l'activation des  $\text{IP}_3\text{Rs}$ . Sans atteindre le niveau d'une vague calcique, l'amplitude du signal calcique générée par les wavelets est plus élevée. Une localisation limitée à la proximité des PME suggèrent que les wavelets sont impliquées dans le contrôle du tonus vasculaire par rétroaction myoendothéliale [29]. La rétroaction myoendothéliale semble atténuer la réponse vasoconstrictrice des CMLVs en présence de PE, par une stimulation des wavelets endothéliales. Tran et Coll. suggèrent que cette rétroaction myoendothéliale implique une hyperpolarisation de la membrane des CEs qui

est transmise aux CMLVs par les jonctions Gap suite à l'activation de cibles potentielles des *wavelets* telles que les canaux potassiques  $K_{Ca3.1}$  exprimés au niveau des PMEs [29]. Leurs études appuient les affirmations concernant la communication bidirectionnelle entre les CEs et les CMLVs par l'entremise des PMEs.



**Figure 16. Les  $Ca^{2+}$  wavelets de l'endothélium vasculaire.**

Les wavelets surviennent au niveau des PMEs suite à l'ouverture des IP3R. Ils sont impliqués dans la régulation du tonus vasculaire par l'activation des canaux  $K_{Ca3.1}$ , qui génère une hyperpolarisation des CEs transmise aux CMLVs, afin de provoquer une vasodilatation.

$Ca^{2+}$ : Calcium,  $IP_3$ : Inositol 1,4,5-triphosphate,  $IP_3R$ : Récepteurs à l' $IP_3$ .  $K_{Ca3.1}$ : canaux potassiques de moyenne conductance activés par le  $Ca^{2+}$ . Adaptée de Charbel et coll. 2013 [298].

### Les « $Ca^{2+}$ sparklets »

Les signalisations calciques locales identifiées précédemment sont principalement déclenchées par une libération de  $Ca^{2+}$  des réserves intracellulaires *via* les  $IP_3R$ s exprimés à la membrane du RE. Les «  $Ca^{2+}$  sparklets » sont caractérisés par un influx calcique provoqué par l'ouverture de canaux ioniques membranaires perméables au  $Ca^{2+}$  (Figure 17, page 55) [42, 222, 228]. Ces événements calciques ont généralement été observés dans les cellules musculaires lisses et cardiaques, mais ont récemment été identifiés dans l'endothélium d'artères mésentériques de

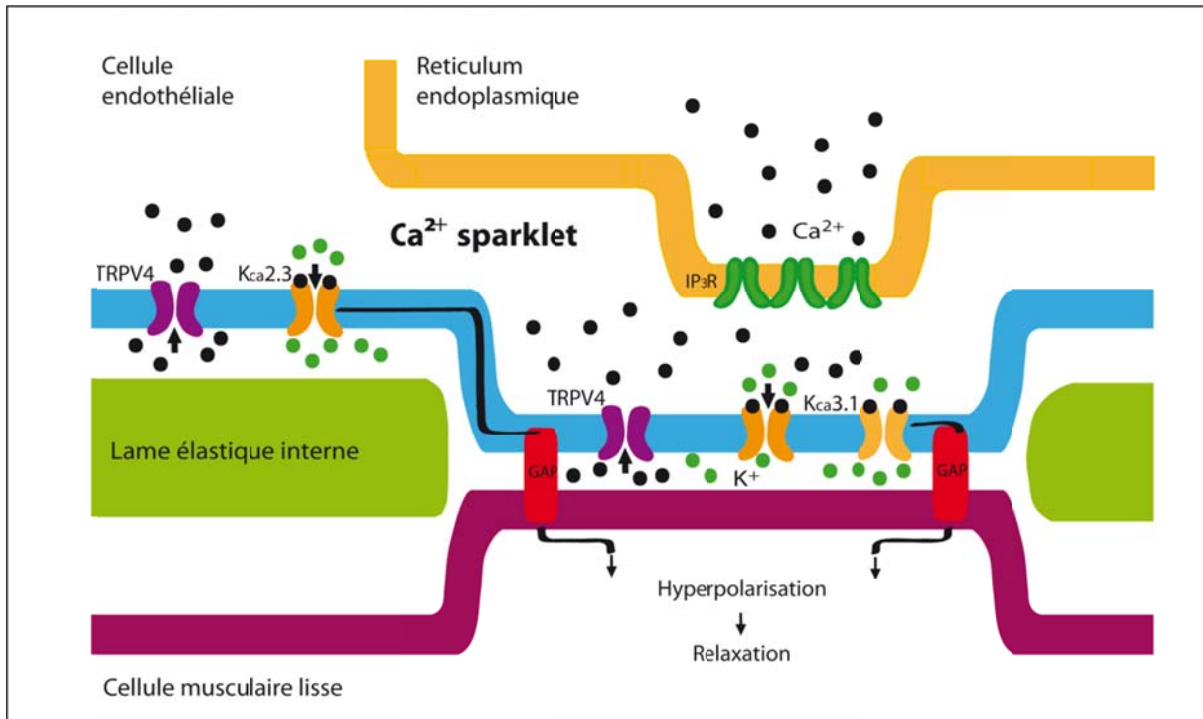
souris. Sonkusare et Coll. ont démontré que les *sparklets* endothéliaux résultent de l'ouverture du canal cationique peu sélectif TRPV4 présent à la membrane plasmique d'artères mésentériques, contrairement à ceux observés dans les myocytes qui dépendent plutôt de l'ouverture des VDCC [42, 319]. Des travaux sur l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  via les canaux TRPV4 ont également été réalisés dans des cellules endothéliales primaires humaines [320]. Toutefois, Sonkusare et Coll. ont caractérisé les  $\text{Ca}^{2+}$  *sparklets*, ou *TRPV4-sparklets*, dans les CE d'artères de mésentériques de souris [42]. En écartant les voies calciques modulées par les  $\text{IP}_3\text{Rs}$  par une pré-incubation des artères au CPA et au U73122, qui inhibe respectivement les pompes SERCA et la PLC, ils ont montré que l'agoniste sélectif des canaux TRPV4, le GSK1016790A (GSK), stimule les  $\text{Ca}^{2+}$  *sparklets*. En démontrant que la GSK n'a aucun effet sur des souris  $\text{TRPV4}^{-/-}$  ou suite à la suppression du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, ils confirment que l'influx calcique provient bien des canaux TRPV4 de la membrane plasmique [42]. Il est intéressant de noter qu'une étude récente ont montré que les *sparklets* endothéliaux peuvent également être générés par les canaux TRPA1 (*TRPA1-sparklets*) dans les artères cérébrales de souris [321].

Les *sparklets* diffèrent des autres signalisations calciques par leurs propriétés biophysiques et leur localisation intracellulaire. Les canaux TRPV4 et TRPA1 sont préférentiellement distribués au niveau des PMEs, mais également aux extrémités des cellules endothéliales [42, 321]. Les canaux potassiques  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  et  $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$  sont des cibles potentielles à l'influx calcique généré par les TRPV4 et TRPA1 [24, 42]. Conjointement aux canaux TRPV4 et TRPA1, les canaux  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  sont localisés au niveau des PMEs, ce qui facilite leur interaction [19]. Sonkusare et coll. ont démontré que le signal calcique généré par les *TRPV4-sparklets* active les canaux  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  et  $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$  (principalement  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$ ), ce qui provoque une hyperpolarisation de la membrane des CE [42]. Cette hyperpolarisation transmise aux CMLVs via les jonctions communicantes Gap résulte en une vasodilatation artérielle, suggérant que les canaux TRPV4 contribuent à la régulation du tonus vasculaire par le mécanisme de l'EDHF. Il est intéressant de noter que le signal calcique local généré par les TRPV4 ainsi que les TRPA1 a la capacité d'engendrer un effet physiologique important en activant uniquement un nombre limité de canaux, ce qui résulte par une vasodilatation artérielle. Toutefois, une stimulation excessive

des *TRPV4-sparklets* avec la GSK engendre une augmentation globale du  $[Ca^{2+}]_i$ , ainsi que des oscillations dans la réponse dilatatrice des vaisseaux [42].

Les *TRPV4-sparklets* auraient également un rôle dans la pathophysiologie vasculaire. Une étude récente suggère que l'interaction démontrée entre la protéine d'ancrage de la kinase A (AKAP150) et TRPV4, ainsi que l'apparition des *TRPV4-sparklets* dans les PME, sont altérées en hypertension artérielle. Cette altération est caractérisée par une diminution de la réponse dilatatrice des artères suite à une stimulation des récepteurs muscariniques [228]. Une activation systémique des TRPV4 suite à une administration de GSK par intraveineuse diminue la pression artérielle et provoque une défaillance générale du système circulatoire [322]. Ces études indiquent donc qu'un faible nombre de canaux TRPV4 endothéliaux module l'homéostasie vasculaire, alors qu'une activation excessive ou diminuée de ces canaux serait impliquée dans les pathologies vasculaires associées à la pression artérielle.

En résumé, les dynamiques calciques globales vont stimuler tous les mécanismes endothéliaux sensibles au  $Ca^{2+}$ , alors que les dynamiques calciques locales ciblent leurs effecteurs. La capacité à ces signaux locaux de finement moduler les diverses fonctions endothéliales présente un avantage énergétique considérable en impliquant uniquement les protéines et ions nécessaires à la réponse physiologique attendue.



**Figure 17. Les  $\text{Ca}^{2+}$  sparklets de l'endothélium vasculaire.**

Les sparklets surviennent d'un influx calcique du milieu extracellulaire par les canaux TRPV4 au niveau de PMEs. Les TRPV4-sparklets vont activer les canaux  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  et  $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$  des PMEs, ce qui engendre une hyperpolarisation des CEs transmise aux CMLVs via les jonctions Gap et ainsi moduler le tonus vasculaire.  $\text{Ca}^{2+}$ : Calcium,  $\text{IP}_3$ : Inositol 1,4,5-triphosphate,  $\text{IP}_3\text{Rs}$ : Récepteurs à l' $\text{IP}_3$ .  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  et  $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ : canaux potassiques de moyenne et petite conductance activés par le  $\text{Ca}^{2+}$ , TRPV4: canaux à potentiel de récepteur transitoire. Adaptée de Charbel et coll. 2013 [298].

## Chapitre 3 – CaMKII vasculaire

Le chapitre 2 a permis de mettre en évidence l'importance des dynamiques calciques endothéliales et des PMEs dans l'homéostasie vasculaire. De nombreux mécanismes régulateurs requièrent l'implication assidue d'une variété de protéines afin de maintenir l'homéostasie calcique endothéliale et ainsi une réponse cellulaire adéquate. Parmi celle-ci on retrouve CaMKII qui a été démontrée par plusieurs comme étant une composante importante dans la régulation des dynamiques calciques ainsi qu'un effecteur éminent. En effet, CaMKII a la capacité unique de moduler son niveau d'activité en fonction de la fréquence des oscillations calciques, lui attribuant ainsi le surnom de « décodeur d'oscillations calciques ».

Les premières études sur CaMKII ont débuté dans le cerveau, étant donné son rôle fondamental et son abondance dans les neurones représentant jusqu'à 2% des protéines totales du cerveau [323]. CaMKII s'avère essentielle pour la mémoire à long terme principalement par sa capacité à décoder les oscillations calciques afin de moduler la formation de dendrites et la libération de neurotransmetteurs [324-328]. Cette intéressante caractéristique a suscité un intérêt important dans la communauté scientifique menant à l'identification et à la caractérisation de CaMKII dans divers autres tissus tels que le cœur et plus récemment, les vaisseaux. L'étude de CaMKII a pris une toute autre direction menant à la compréhension de son mécanisme d'activation, de ses différentes cibles et de ses fonctions cellulaires en physiopathologies cardiovasculaires [329]. La mise en évidence de son implication dans la régulation de l'expression génique et des dynamiques calciques a permis de relever un rôle majeur de CaMKII dans l'arythmie et l'hypertrophie cardiaque [330-332]. Au niveau vasculaire, l'étude des différentes fonctions de CaMKII est beaucoup moins explorée comparativement au myocarde. D'ailleurs, la majorité des études tentent de comprendre les fonctions de CaMKII principalement au niveau des CMLVs. CaMKII dans les CMLVs est impliquée dans la migration et la prolifération cellulaire, ainsi que dans l'hypertrophie et la contraction vasculaire [333-339]. L'association intime entre ces mécanismes et l'athérosclérose ou l'hypertension a été récemment confirmée par plusieurs études montrant un lien direct entre CaMKII et les pathologies vasculaires [333, 336, 340, 341]. D'autre part, CaMKII a également été identifiée au niveau des CEs. En revanche, peu d'informations sur les



fonctions endothéliales impliquant CaMKII en physiopathologie ont été colligées étant donné la complexité qu'apporte l'étude de ce type cellulaire. Enfin, les différentes cibles de CaMKII sont intimement impliquées dans diverses pathologies cardiovasculaires, d'où l'importance d'une meilleure compréhension des voies de signalisations de CaMKII, ce qui permettra le développement de nouvelles thérapies.

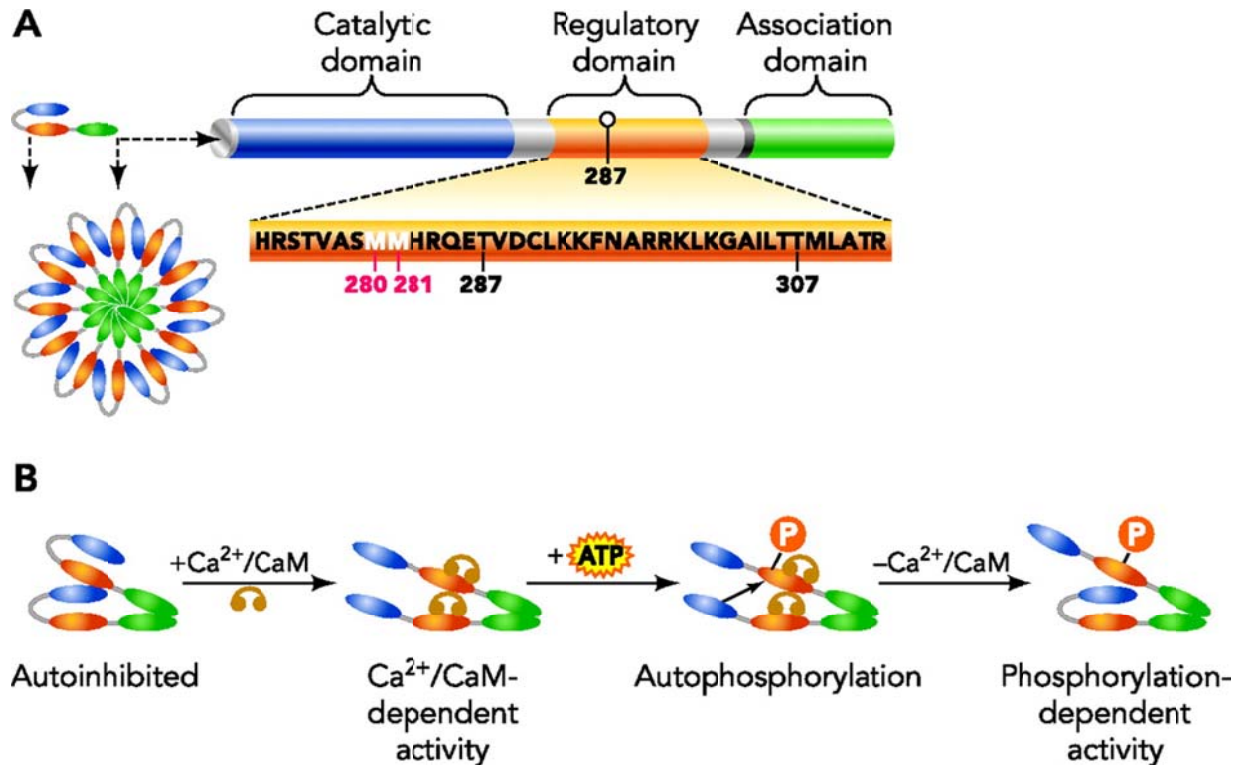
### **3.1 La structure et les isoformes de CaMKII**

CaMKII mérite tout l'intérêt qu'elle a suscité depuis plusieurs années principalement pour sa structure unique et ses propriétés d'autorégulation. Ces caractéristiques lui permettent d'intégrer un signal calcique en une réponse cellulaire spécifique. Chez les mammifères, CaMKII est une protéine ubiquitaire exprimée sous quatre isoformes soit  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$  codés par différents gènes et ayant chacune plusieurs variantes [342]. L'expression de CaMKII a tout d'abord été décrite comme restreinte au niveau du cerveau. Toutefois, de nombreuses études ont ensuite démontré que CaMKII est présente dans plusieurs autres tissus. CaMKII $\alpha$  et  $\beta$  semblent être principalement exprimées dans le cerveau, tandis que CaMKII $\delta$  et  $\gamma$  ont été identifiées dans le cœur, les poumons, l'aorte et les testicules [343]. La structure fonctionnelle de CaMKII a été déterminée par de nombreuses études en biochimie, microscopie électronique et cristallographie [344-347]. L'enzyme est constituée de 6 à 12 sous-unités assemblées en homo- ou hétéromultimère. L'équipe du Dr Schulman a démontré que l'hétéromultimère est formé principalement de la combinaison de CaMKII $\alpha/\beta$  dans les neurones [348]. Néanmoins, aucune étude ne semble contredire la possibilité d'une autre combinaison d'isoformes formant l'hétéromultimère.

Individuellement, les isoformes ont conservé une grande homologie [343]. Elles partagent la même topologie pour chaque sous-unité, qui inclut un domaine d'association C-terminal, un domaine régulateur central contenant le site de liaison à la calmoduline, ainsi qu'un domaine catalytique N-terminal (Figure 18, page 59). Il est intéressant de noter que les quatre isoformes possèdent toutefois des propriétés intrinsèques (par exemple, la sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$ ) qui peuvent différer et une localisation cellulaire distinctes (revue de la littérature [349-351]). Ces différences vont généralement être causées par des variations au niveau du domaine régulateur ou du domaine d'association. Bayer et coll. se sont particulièrement intéressés à la différence

d'affinité à la calmoduline entre les variantes de CaMKII $\beta$  puisqu'elle influence la réponse aux différentes fréquences calciques [342]. D'autres ont démontré que CaMKII $\alpha$  a une affinité plus faible à la calmoduline que l'isoforme  $\beta$  [348]. Ce paramètre peut expliquer les différents niveaux d'activités observés entre les isoformes de CaMKII et les variantes d'une même isoforme en réponse aux fréquences variables d'oscillations calciques [318].

D'autre part, il est maintenant bien établi que la localisation intracellulaire, ainsi que la translocation spatiale de CaMKII en réponse à un stimulus jouent un rôle primordial dans la fonction de chaque isoforme [349, 351]. De nombreuses études se sont intéressées à la capacité unique à CaMKII $\beta$  de lier la F-actine et par conséquent, subir une translocation vers des régions spécifiques telles que les épines dendritiques [324, 352, 353]. CaMKII $\beta$  associée à la F-actine va moduler la translocation de l'hétéromultimère composé également de CaMKII $\alpha$  [353, 354]. La localisation et la translocation de CaMKII $\beta$  ont été démontrées essentielles pour la formation de dendrites et de synapses, importantes pour la mémoire à long terme et l'apprentissage [355, 356]. De plus, les différentes variantes de CaMKII $\alpha$  et  $\delta$  possèdent également une localisation préférentielle pouvant être impliquée dans les différences fonctionnelles entre les variantes et isoformes. CaMKII $\alpha_B$  (cerveau) et CaMKII $\delta_B$  (cardiomyocytes) ont une séquence spécifique au niveau du domaine régulateur contenant un signal nucléaire de localisation les dirigeant directement au noyau [357, 358]. Cette particularité est essentielle pour leur rôle dans la transcription génique au niveau du cerveau et des cardiomyocytes, respectivement [359, 360]. D'un autre côté, CaMKII $\delta_C$  impliquée dans la régulation de l'homéostasie calcique des cardiomyocytes est principalement localisée au niveau de la membrane du réticulum sarcoplasmique [361, 362]. Il est évident que la localisation intracellulaire de chaque variante ou isoforme joue un rôle primordial dans leurs fonctions respectives.



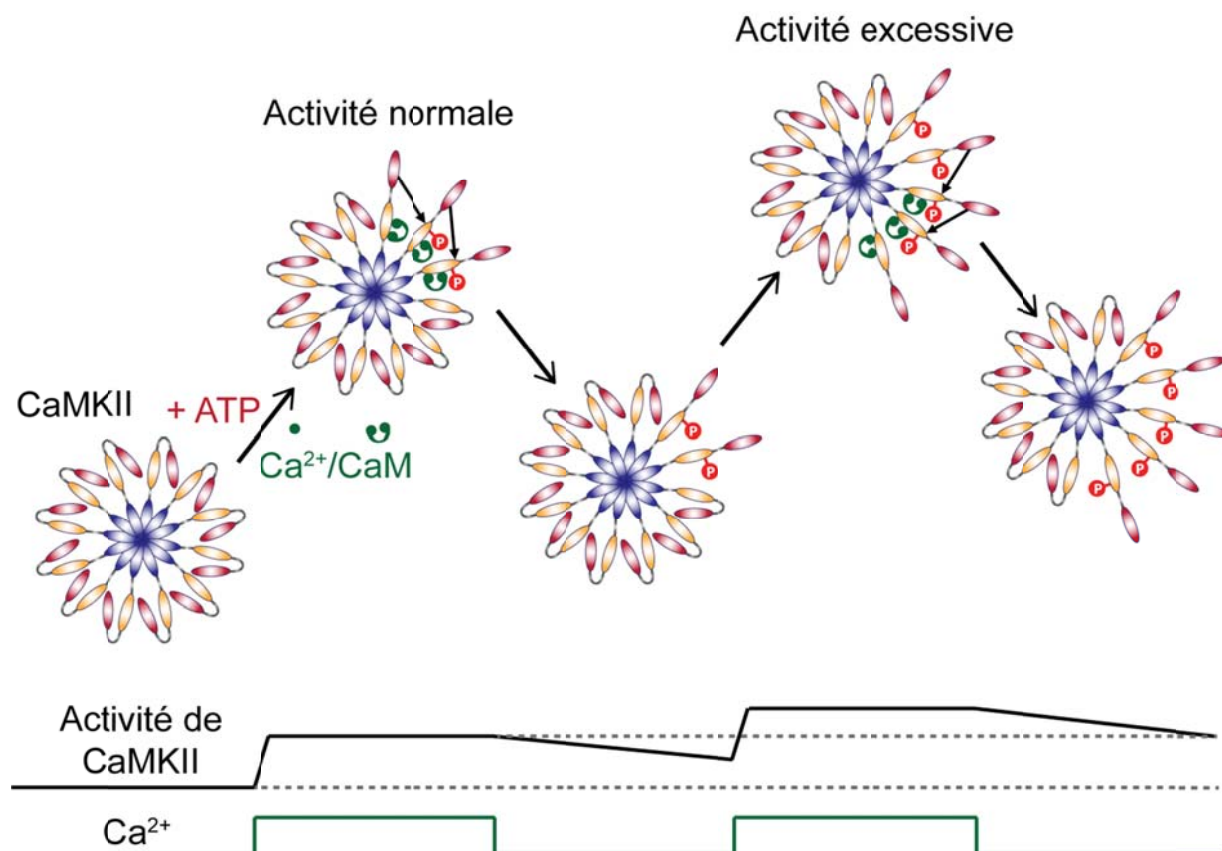
**Figure 18. Structure et activation de CaMKII.**

A. La structure monomérique d'une sous-unité de CaMKII comprend un domaine catalytique à l'extrémité N-terminal, un domaine régulateur ainsi qu'un domaine d'association à l'extrémité C-terminal. Le domaine régulateur possède une séquence contenant le pseudosubstrat de CaMKII auquel le domaine catalytique s'y lie en condition basale, un domaine de liaison pour la calmoduline, un site d'autophosphorylation activatrice (Thr286 ou 287 selon l'isoforme), un site d'oxydation (Mer281/282) ainsi qu'un site d'autophosphorylation inhibitrice (Thr306 ou 307). L'enzyme fonctionnel est une multimère formée entre 6 à 12 sous-unités, assemblées par leur domaine d'association. B. Lorsque CaMKII est autohibée, le domaine catalytique se lie au domaine régulateur. Une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  favorise la liaison du complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline au domaine régulateur de la sous-unité, engendrant un changement conformationnel qui libère le domaine catalytique. Cette conformation expose le résidu Thr286 pouvant ainsi être phosphorylé par une sous-unité adjacente. Cette autophosphorylation permet à CaMKII d'acquérir une activité indépendante au  $Ca^{2+}$ . Cette caractéristique permet à l'enzyme de fonctionner comme un décodeur d'oscillations calciques et ainsi adapter son niveau d'activation. D'après Couchonnal et coll. 2008 [329]. ATP : adénosine triphosphate,  $Ca^{2+}$  : calcium, CaM : calmoduline, M: méthionine. T: thréonine P: phosphate.

### 3.2 Mécanismes d'activation de CaMKII

Les mécanismes d'activation et d'autorégulation de CaMKII font également la particularité de cette enzyme puisqu'ils lui procurent sa propriété unique de décoder les différentes oscillations calciques. Au repos l'enzyme multimérique est sous une conformation inactive, c'est-à-dire que le domaine catalytique de chacune des sous-unités interagit avec la région

autoinhibitrice du domaine régulateur. Une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  engendre la formation du complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline, qui peut ensuite s'associer au domaine régulateur d'une sous-unité de CaMKII (Figure 18 et 19). Cette association provoque un changement de conformation qui active cette sous-unité de CaMKII en libérant le domaine catalytique du domaine régulateur. Une fois l'autoinhibition levée, la serine/thréonine kinase peut ainsi phosphoryler ses différents substrats en permettant le transfert du groupement phosphate provenant de l'ATP. Le KN-93, un inhibiteur sélectif et compétitif de CaMKII, va se lier directement au site de liaison de la calmoduline sur le domaine régulateur afin d'empêcher l'activation de la kinase. Suite à l'activation dépendante de la liaison du complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline, la structure multimérique de CaMKII lui donne la capacité de s'autophosphoryler. Le changement de conformation de la protéine expose également le résidu Thr286 (ou Thr287 pour CaMKII $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$ ) du domaine régulateur. Ainsi, une sous-unité active de CaMKII peut phosphoryler le résidu Thr286 d'une sous-unité adjacente de la même enzyme, préalablement activée par le complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline. Cette autophosphorylation permet à CaMKII de maintenir une activité catalytique en absence de  $Ca^{2+}$  suite à la dissociation du complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline et ainsi avoir une activité indépendante du  $Ca^{2+}$ , également nommée activité autonome (Figure 18 et 19). D'ailleurs, c'est cette caractéristique de CaMKII, ainsi que sa structure multimérique, qui lui permet d'agir comme un décodeur de  $Ca^{2+}$  et par conséquent, avoir divers niveaux d'activité basés sur la fréquence et la durée d'exposition au  $Ca^{2+}$  (Figure 19, page 61). Des études *in vitro* ont démontré que la structure de CaMKII est essentielle pour la diversité des niveaux d'activité acquis par l'autophosphorylation des sous-unités [363]. La réponse cellulaire engendrée par CaMKII dépend également du nombre de sous-unités phosphorylées, ainsi que de la vitesse de déphosphorylation. L'autophosphorylation en Thr286 va également diminuer la vitesse de dissociation du complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline de 1 000 fois [364]. Cette propriété de CaMKII, nommé « *CaM-Trapping* », permet une activation complète d'une plus longue durée des sous-unités, ce qui augmente le taux d'activation de CaMKII lors d'une augmentation subséquente de  $Ca^{2+}$  [364].



**Figure 19. Activité de CaMKII: décodeur d'oscillations calciques.**

Lors d'une augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$ , la liaison du complexe  $Ca^{2+}$ /calmoduline à CaMKII engendre un changement de conformation qui permet à l'enzyme de phosphoryler une sous-unité adjacente préalablement activée. Cette autophosphorylation procure à CaMKII une activité indépendante au  $Ca^{2+}$ , demeurant ainsi active en absence de  $Ca^{2+}$  (activité normale). Une augmentation subséquente de  $Ca^{2+}$  permet d'activer les sous-unités qui n'ont pas été activées lors de la première augmentation de  $Ca^{2+}$ , engendrant une activation/activité excessive de CaMKII. Ainsi, CaMKII a la capacité de décoder les différentes oscillations calciques. ATP : adénosine triphosphate,  $Ca^{2+}$  : calcium, CaM : calmoduline.

Récemment, un nouveau mécanisme d'activation de CaMKII par oxydation a été identifié par l'équipe de Mark E. Anderson, suggérant un rôle en tant que décodeur du stress oxydant. De nombreuses évidences ont d'abord montré une augmentation de l'activité de CaMKII dans un environnement cellulaire pro-oxydant [332, 365, 366]. Toutefois, l'équipe de Mark E. Anderson a démontré que l'oxydation des résidus méthionine 281/282 (Met281/282) du domaine régulateur active CaMKII par un mécanisme analogue à l'autophosphorylation [367]. L'oxydation des méthionines est conservée pour CaMKII $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$ , mais le premier résidu de méthionine est substitué par une cystéine (Cys280) pour CaMKII $\alpha$ . Tout comme la

phosphorylation en Thr286, l'activation de CaMKII par oxydation requiert initialement la liaison du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline. Ainsi, une oxydation des Met281/282 prévient la réassociation du domaine catalytique à la région autoinhibitrice du domaine régulateur, similairement à l'autophosphorylation. L'activation de CaMKII par oxydation permet de maintenir une activité indépendante au  $\text{Ca}^{2+}$ , telle que l'autophosphorylation. L'équipe de Mark E. Anderson a démontré que les ROS produits suite à une infusion chronique d'AngII stimulent l'activité de CaMKII par oxydation dans le cœur [332]. À l'aide d'un antisérum utilisé pour identifier CaMKII oxydée en Met281/282 (ox-CaMKII), ils ont établi que l'oxydation de CaMKII est impliquée dans l'apoptose des cardiomyocytes en réponse à une augmentation des ROS par l'AngII. D'ailleurs, une exposition aigue à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  ou une exposition de 24 heures avec de l'AngII augmente le niveau de ox-CaMKII. Les souris n'exprimant plus la sous-unité p47<sup>phox</sup> de la NADPH oxydase (p47<sup>phox-/-</sup>), une sous-unité primordiale pour la production de ROS *via* la NADPH oxydase, ne montrent aucune augmentation de ox-CaMKII en réponse à l'AngII. Similairement aux phosphatases qui clivent le phosphate en Thr286, la méthionine sulfoxyde réductase (MsrA) réduit l'oxydation des méthionines. Une infusion chronique d'AngII chez des souris MsrA<sup>-/-</sup> montrent une augmentation de ox-CaMKII et de l'apoptose des cardiomyocytes. Enfin, ces travaux ont démontré que l'état redox de la cellule peut moduler l'activation de CaMKII, ce qui permet à cette kinase d'intégrer non seulement les signaux  $\text{Ca}^{2+}$ , mais également les ROS. Le lien entre le stress oxydant et les pathologies cardiovasculaires est déjà bien établi. L'activation de CaMKII par les ROS permet de renforcer la compréhension des voies de signalisations impliquées dans ces pathologies.

CaMKII a également la capacité de s'autoréguler en phosphorylant le résidu Thr306/307 présent au niveau du domaine régulateur. Contrairement à la phosphorylation en Thr286 ou l'oxydation en Met281/282 qui a pour objectif de maintenir l'activation de CaMKII, l'autophosphorylation du résidu Thr306/307 diminue le niveau d'activité de CaMKII en prévenant la liaison du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline. Brièvement, lorsqu'une sous-unité est active et indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , le résidu Thr306/307 devient alors accessible pour être phosphorylé, ce qui préviendrait une association subséquente du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline à la sous-unité et une activation maximale [368]. Néanmoins, cette autophosphorylation

inhibitrice ne change pas l'activité indépendante déjà acquise de l'enzyme. Elle ne fait qu'éliminer la sensibilité de la sous-unité active à la liaison du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline. Enfin, ce mécanisme de régulation négative semble également se produire en absence d'une activation préalable de l'enzyme, c'est-à-dire à un niveau basal de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , empêchant ainsi l'activation initiale de la sous-unité [369, 370]. L'hypothèse émise expliquant ce phénomène est la proximité entre le résidu Thr306/307 et le site catalytique.

Outre l'autophosphorylation en Thr286 et Thr306/307, certaines équipes ont identifié un autre site de phosphorylation en Thr253 qui n'a été étudié que dans les neurones [371-373]. L'équipe de Rostas a montré qu'une autophosphorylation du résidu Thr253 peut se produire *in vivo* et ne semble pas altérer l'activité catalytique dépendante ou indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  de CaMKII [373, 374]. Ce mode d'activation requiert une première phosphorylation dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , sans tout de même en exiger la présence constante [372]. De plus, des évidences ont montré que cette phosphorylation survient préférentiellement au niveau des densités postsynaptiques et augmente la translocation de CaMKII dans ces microdomaines [372, 373]. Ces travaux suggèrent donc que la phosphorylation en Thr253 joue un rôle essentiellement sur la translocation de CaMKII. Ce mécanisme de régulation n'a jusqu'à présent été démontré qu'au niveau cérébral.

### **3.3 Les cibles et fonctions de CaMKII**

CaMKII est une enzyme ubiquitaire multifonctionnelle qui depuis plusieurs années génère un intérêt grandissant dans la communauté scientifique en raison de ses nombreux substrats. De multiples études se sont donc intéressées à comprendre les différentes cibles et fonctions de CaMKII, ainsi que leurs relations avec sa distribution et sa translocation intracellulaire. Il est important de comprendre que les fonctions de CaMKII sont directement associées à sa structure et ses mécanismes de régulation. Sa structure multimérique ainsi que sa caractéristique unique d'autophosphorylation lui permet de décoder les différentes oscillations calciques intracellulaires. Ainsi, CaMKII est essentielle pour divers processus physiologiques impliquant le  $\text{Ca}^{2+}$ . CaMKII a également la capacité d'intégrer les signaux des ROS en réponses physiopathologiques spécifiques. Aujourd'hui, de nombreuses revues de la littérature mettent en perspective les différentes fonctions et mécanismes de régulation de CaMKII selon

son expression et sa distribution intracellulaire. CaMKII a été identifiée dans plusieurs types cellulaires dans lesquels ses diverses cibles font de cette kinase un élément essentiel dans la régulation de l'homéostasie calcique, des canaux ioniques, du potentiel membranaire, du métabolisme, de la sécrétion vésiculaire, du trafic des protéines, de la transcription génique et du cycle/survie cellulaire. Les données colligées mettent en évidence les différentes cibles et fonctions de CaMKII, ainsi que leur relation avec sa localisation intracellulaire, dépendamment du type cellulaire [375]. Cette section va résumer brièvement les divers rôles de CaMKII.

Initialement, CaMKII a été caractérisée dans le cerveau en tant que « molécule mémoire » capable d'intégrer les signaux calciques afin de réguler l'excitabilité neuronale et la transmission synaptique [376]. CaMKII associée aux vésicules synaptiques provoque la libération de neurotransmetteurs en phosphorylant divers substrats (synapsine I, synaptotagmine, synaptophysine) [377, 378]. Les premières études ont permis de montrer que CaMKII est essentielle dans la potentialisation à long terme (PLT) et par conséquent dans l'apprentissage et la mémoire [377] [379]. Des souris *knout-out* pour le gène de CaMKII $\alpha$  ou une mutation du résidu Thr286 en une alanine ou un aspartate montrent effectivement un trouble dans l'apprentissage et la mémoire causé par une perturbation importante de la plasticité synaptique [377]. Ces nombreuses études ont révélé également l'importance de la translocation de CaMKII neuronale, particulièrement vers les épines dendritiques, pour exécuter ses différentes fonctions en réponse à une augmentation de Ca<sup>2+</sup>. Les nombreux substrats de CaMKII au niveau neuronal ont suscité un énorme intérêt de la communauté scientifique. Depuis, de nombreuses d'études ont démontré que CaMKII est également impliquée dans la régulation de l'homéostasie calcique, des canaux ioniques, de l'expression génique, de la motricité cellulaire, ainsi que dans le réarrangement du cytosquelette dans divers autres types cellulaires.

Suite à l'explosion des études au niveau cérébral, CaMKII a ensuite généré un grand intérêt dans le système cardiovasculaire, principalement pour son implication dans diverses pathologies cardiaques telles que les arythmies et la défaillance cardiaque [329, 380]. CaMKII a la capacité de phosphoryler diverses protéines impliquées dans la régulation de



l'homéostasie calciques telles que les RyRs, les pompes SERCA, le PLB, les IP<sub>3</sub>Rs ainsi que les canaux calciques de type L. Plusieurs études sur les cardiomyocytes et en plus petite proportion sur les CMLVs ont montré que CaMKII peut moduler la libération et la recapture du Ca<sup>2+</sup> vers les réserves intracellulaires, ainsi que l'entrée de Ca<sup>2+</sup> du milieu extracellulaire. CaMKII peut phosphoryler les RyRs (RyR2), ce qui stimule la libération du Ca<sup>2+</sup> provenant du SR [381, 382]. Toutefois, certains résultats semblent être contradictoires, suggérant plutôt une boucle de rétroaction négative. Une phosphorylation des RyR2 par CaMKII, suite à une augmentation du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, perturberait la probabilité d'ouverture des récepteurs, ce qui diminuerait la libération du Ca<sup>2+</sup> et par conséquent les *Ca<sup>2+</sup> sparks* et les *Ca<sup>2+</sup> waves* [383]. CaMKII est également impliquée dans la recapture du Ca<sup>2+</sup> vers les réserves intracellulaires, diminuant ainsi le [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en phosphorylant les pompes SERCA ou le PLB [384-387]. La phosphorylation du PLB relève l'inhibition exercée sur la pompe SERCA, ce qui stimule davantage la recapture du Ca<sup>2+</sup>. De plus, des évidences suggèrent que la protéine d'ancrage de la kinase  $\alpha$  ( $\alpha$ KAP) permet de cibler CaMKII au SR du muscle squelettique afin de réguler l'homéostasie calcique [388]. Ce phénomène soulève l'importance de la localisation intracellulaire de CaMKII pour ses fonctions. D'un autre côté, CaMKII peut également phosphoryler les IP<sub>3</sub>Rs, réduisant leur probabilité d'ouverture et par conséquent diminuer l'augmentation du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> [389, 390]. À l'opposé, CaMKII peut provoquer une entrée de Ca<sup>2+</sup> du milieu extracellulaire en phosphorylant les canaux calciques activés par le voltage (Cav1.2) dans les cardiomyocytes et les CMLs. Il a été démontré que des inhibiteurs de CaMKII ou des souris transgéniques exprimant le peptide inhibiteur AC3-I peuvent inhiber le courant calcique *via* les Cav1.2 [391, 392]. Il est évident qu'au niveau cardiaque CaMKII peut moduler le [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en agissant sur les différentes composantes impliquées dans l'homéostasie calcique. Bien qu'en plus faible proportion, des études ont montré tout de même un lien entre CaMKII et l'homéostasie calcique dans les CMLVs et les CEs.

CaMKII multifonctionnelle est également impliquée dans la régulation du potentiel membranaire en modulant différents courants (calcique, sodique et potassique). Outre les canaux calciques, dans les cardiomyocytes CaMKII semble pouvoir moduler le potentiel d'action en phosphorylant les canaux sodique voltage-dépendants (Nav1.5). De plus, les canaux potassiques voltage-dépendants (K<sub>V</sub>), les canaux BK<sub>Ca</sub> ainsi que les canaux K<sub>ir</sub>

semblent également être des cibles de CaMKII dans divers types cellulaires [393-396]. Enfin, CaMKII possède de nombreuses autres fonctions telles que la modulation de l'expression génique, du métabolisme et de la sécrétion d'insuline, en plus d'être impliquée à différents niveaux dans le cycle cellulaire et la survie. Le mécanisme d'activation par oxydation récemment caractérisé par Mark E. Anderson et coll. procure à CaMKII une nouvelle fonction de senseur des ROS. CaMKII a la capacité d'intégrer les signaux calciques et oxydatifs en des réponses cellulaires spécifiques. En conclusion, les nombreuses cibles de CaMKII font de cette kinase ubiquitaire un important modulateur des fonctions cellulaires.

### **3.4 CaMKII vasculaire**

Au niveau vasculaire très peu d'études permettant d'approfondir nos connaissances sur les différents mécanismes d'activation et de régulation de CaMKII ont été effectuées comparativement aux études au niveau cérébral et cardiaque. Les informations sur la fonction de CaMKII vasculaire se rapportent principalement aux CMLVs, alors que peu d'études dans l'endothélium vasculaire sont colligées. Cependant, de récentes évidences suggèrent un rôle de CaMKII dans le développement de pathologies vasculaires *in vivo* telles que l'hypertension artérielle [336, 340, 341].

#### **3.4.1 CaMKII dans les cellules musculaires lisses vasculaires**

Les CMLVs sont intimement associées à différentes pathologies vasculaires telles que l'athérosclérose et l'hypertension. Des changements dans la prolifération, la migration, l'hypertrophie et la contraction cellulaire sont souvent des mécanismes impliqués dans ces pathologies. CaMKII est maintenant reconnue pour participer à ces changements phénotypiques des CMLVs.

CaMKII est généralement exprimée sous les isoformes  $\delta$  et  $\gamma$  dans les CMLVs. Toutefois, il a été démontré que les CMLVs différenciées expriment principalement CaMKII $\gamma$  alors que des cellules en prolifération ou en culture expriment davantage l'isoforme  $\delta$  [341]. Une corrélation a été établie entre les changements vasculaires qu'engendre une lésion de la carotide, soit la formation de néointima et l'augmentation de l'expression de CaMKII $\delta$  dans ce modèle. Une ligature de la carotide chez les souris CaMKII $\delta^{-/-}$  montre une diminution significative de la

formation de néointima comparativement aux souris contrôles [333, 397]. La diminution du nombre de cellules dans l'intima et la média ( $\approx 78\%$  et  $45\%$ , respectivement), ainsi que l'abolition de l'extension de la IEL chez la souris CaMKII $\delta^{-/-}$ , suggèrent l'implication de CaMKII $\delta$  dans la prolifération et la migration des CMLVs [333]. Le mécanisme moléculaire par lequel CaMKII $\delta^{-/-}$  diminue la prolifération cellulaire implique l'inhibiteur du cycle cellulaire p21, puisque son expression est significativement augmentée dans ce modèle de souris [333]. CaMKII possède de nombreuses autres cibles impliquées dans le cycle cellulaire telles que le complexe ERK/Raf1 lui permettant de réguler la prolifération et la migration des CMLVs [337]. D'ailleurs, de nombreuses évidences ont montré que CaMKII est directement impliquée dans la migration des CMLVs. Une surexpression de CaMKII $\delta$  stimule la migration des cellules, alors que CaMKII $\delta^{-/-}$  ou des souris déficientes en ox-CaMKII montrent une diminution de la migration des CMLVs. Ce mécanisme semble impliquer la métalloprotéinase MMP9 qui dégrade la matrice extracellulaire afin de promouvoir la migration des cellules [334]. Il a été démontré par immunofluorescence qu'une ligature de la carotide augmente le niveau d'ox-CaMKII et de MMP9, alors qu'une suppression de CaMKII $\delta$  est associée à une diminution de MMP9 [334].

Outre la prolifération et la migration des CMLVs, CaMKII joue également un rôle important dans l'hypertrophie tel que démontré dans les cardiomyocytes. Dans un modèle d'hypertension induite par l'AngII, une caractéristique du phénotype des vaisseaux est l'hypertrophie des CMLVs contribuant à la contractilité des cellules [336, 338]. Une infusion d'AngII en présence de KN-93, l'inhibiteur de CaMKII, réduit la pression artérielle en plus de diminuer l'hypertrophie des CMLVs [336]. Ce phénomène est également observé dans les CMLVs aortiques transfectées par des adénovirus exprimant le peptide inhibiteur de CaMKII (CaMKIIN) [336]. D'un autre côté, une surexpression de CaMKII augmente l'hypertrophie des CMLVs suite à une administration d'AngII. Le mécanisme associant l'hypertrophie induite par l'AngII et CaMKII dépend de la phosphorylation des histones désacétylases 4 (HDAC4) par CaMKII aux sites connus (Ser467 et Ser632) [336, 398]. Les résultats de cette étude suggèrent que CaMKII est directement impliquée dans l'hypertrophie des CMLVs induite par l'AngII et ceci, indépendamment de la pression artérielle.

Le rôle de CaMKII dans la contraction des CMLVs n'est pas tout à fait établi comme dans les cardiomyocytes, mais des évidences ont montré une association avec la machinerie contractile. De nombreux substrats de CaMKII tels que la MLCK, la MLC20, la caldesmone et la calponine ont été identifiés dans le muscle lisse, suggérant un rôle pour CaMKII dans la régulation de la contractilité vasculaire. De plus amples études ont permis d'étudier l'impact de CaMKII sur la contraction de l'aorte de furet en utilisant des oligonucléotides anti-sens contre CaMKII $\gamma$  afin d'empêcher son action [338]. Dans un montage d'anneaux aortiques dénudés d'endothélium, la contraction induite par le chlorure de potassium (KCl) est significativement diminuée lorsque CaMKII est bloquée [338]. D'ailleurs, ces résultats sont similaires à ceux obtenus en inhibant CaMKII avec le KN-93[339]. Dans cette étude, ils ont démontré également qu'une inhibition de CaMKII réduit la phosphorylation de la MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) et de MLC20 impliqués dans la machinerie contractile des CMLVs [339]. En résumé, ces évidences ainsi que le nombre important de substrats de CaMKII impliqués dans la contraction vasculaire, suggèrent un rôle essentiel de CaMKII dans la vasoconstriction.

D'un autre côté, il est bien établi que CaMKII peut moduler l'homéostasie calcique dans les cardiomyocytes et ainsi modifier le potentiel d'action et la contraction. L'équipe de Grumbach a tenté de comprendre le rôle de CaMKII dans les CMLVs en utilisant des artères mésentériques de souris transgéniques exprimant le peptide inhibiteur CaMKIIN spécifiquement dans les CMLVs [399]. Dans cette étude, la diminution de l'activité de CaMKII provoque une diminution de la durée du potentiel d'action. Similairement aux cardiomyocytes, une inhibition de CaMKII dans les CMLVs diminue l'influx calcique *via* les canaux calciques de types L en réponse à l'AngII [399-401]. Ce phénomène semble être la conséquence d'une diminution du niveau de phosphorylation par CaMKII de la sous-unité régulatrice  $\beta 3$  du canal calcique voltage-dépendant (Cav $\beta 3$ ) [399, 402]. De plus, l'inhibition de CaMKII semble avoir un impact direct sur le contenu en  $\text{Ca}^{2+}$  du SR en perturbant le mécanisme de recapture du  $\text{Ca}^{2+}$ . L'inhibition de CaMKII réduit le niveau de phosphorylation du PLB, conservant ainsi son inhibition sur la pompe SERCA et par conséquent, empêche la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  [399]. Enfin, ces travaux ont montré que CaMKII est impliquée dans la régulation de l'homéostasie calcique. Toutefois, aucune différence n'a été observée quant à la

réponse vasoconstrictrice induite par un agoniste, ce qui pourrait être la conséquence d'effets opposés générés suite à l'inhibition de CaMKII.

### **3.4.2 CaMKII dans les cellules endothéliales**

Les CEs, bien que moins nombreuses comparativement aux CMLVs, sont primordiales pour le maintien de l'homéostasie vasculaire. Toutefois, l'étude de l'endothélium vasculaire génère certaines difficultés étant donné son faible nombre de cellules et sa délicatesse, justifiant le peu de travaux effectués sur ce type cellulaire. D'un autre côté, la culture cellulaire pourrait être une bonne alternative, cependant elle possède d'importantes conséquences sur l'expression de certaines protéines et le phénotype de ces cellules en altérant entre autres leur polarité et leurs structures secondaires telles que les PMEs. En effet, l'identification de CaMKII dans les CEs semble varier selon le type de cellules en culture. Deli et coll. ont d'abord démontré par hybridation *in situ* et Western Blot l'expression de CaMKII $\alpha$  dans les CEs en culture primaire provenant du cerveau de rat [403]. Ensuite, dans les CEs d'artères pulmonaires, l'utilisation d'un anticorps contre toutes les isoformes de CaMKII (pan-anti-CaMKII) en Western Blot montre une seule bande à 52 kDa qui correspondrait à l'isoforme  $\alpha$  de CaMKII [151]. Toutefois, une bande à 50 kDa a été observée dans les HUVEC (CEs humaines de la veine de cordon ombilical), les BAEC (CEs d'aorte bovine) et les HDMEC (CEs humaines de micro-vaisseaux du derme) [404]. Les auteurs ont déterminé que cette bande correspondrait à CaMKII $\delta$ , étant donné que CaMKII $\alpha$  et  $\beta$  semblaient restreintes au cerveau, concluant ainsi que CaMKII $\delta$  est l'isoforme prédominante dans ces CEs. Balla et coll. ont identifié l'expression de l'ARNm de CaMKII $\gamma_b$ ,  $\gamma_c$  et CaMKII $\delta_2$  uniquement dans les BCEC4 (lignée 4 de CEs immortalisées de capillaires cérébrales) [405]. Néanmoins, l'étude de CaMKII dans les CEs montre encore une fois que la diversité de substrats fournit à CaMKII la capacité d'être multifonctionnelle. En effet, CaMKII est impliquée dans plusieurs fonctions endothéliales telles que la perméabilité vasculaire, l'angiogenèse, l'homéostasie calcique et le tonus vasculaire permettant de moduler l'homéostasie vasculaire.

D'abord, CaMKII semble jouer un rôle essentiel dans la perméabilité vasculaire en modulant les jonctions intercellulaires des CEs. Une étude sur des CEs isolées d'artères pulmonaires bovines (BPAEC) en culture montre qu'en présence du peptide inhibiteur CaM, qui mime un

site de CaMKII sur la filamine, la translocation des filamines et le réarrangement de la F-actine en réponse à la Bk sont significativement diminués [406, 407]. La phosphorylation de la filamine par CaMKII semble altérer la barrière des CEs par un mécanisme suggérant une redistribution de la filamine, ce qui engendre une perturbation du réseau du cytosquelette, de l'intégrité des jonctions intracellulaires et par conséquent de la perméabilité vasculaire [406-409]. De plus, l'augmentation de la formation de jonctions gap en réponse à la Bk est inhibée en présence du peptide CaM, suggérant un rôle important de CaMKII dans la régulation des jonctions intracellulaires [406]. Dans les CEs, les jonctions gaps sont conçues entre autres de Cx43 qui est une cible pour CaMKII telle que démontrée par Huang et coll. [406, 410]. La perméabilité vasculaire est perturbée en présence du peptide CaM qui prévient également la translocation de NOS3 de la membrane cellulaire, donc son activation, suite à une stimulation avec la Bk [406]. D'autre part, il a été démontré que la voie de signalisation par laquelle la thrombine engendre une dysfonction dans la barrière endothéliale implique CaMKII. Une stimulation des BPAECs ainsi que des HUVEC par la thrombine semble augmenter le niveau d'activation de CaMKII révélé par une augmentation de l'autophosphorylation en Thr286 de CaMKII ainsi que la phosphorylation de ses substrats [404, 408]. À l'opposé, en présence de KN-93, la perméabilité cellulaire est diminuée en réponse à la thrombine. Il a été suggéré que le mécanisme sous-jacent de ce phénomène implique l'activation de ERK, puisque la présence de KN-93 diminue son activation et atténue la contractilité de l'actine en réponse à la thrombine [411]. En résumé, tous ces mécanismes sont impliqués dans la perméabilité des CEs, ce qui fait de CaMKII un important modulateur de l'homéostasie vasculaire. De nombreuses autres cibles font également de CaMKII un important régulateur de la migration des CEs impliquée dans l'angiogenèse [412, 413]. Une stimulation de la migration des CEs de la rétine bovine par le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) implique une activation d'Akt qui est sensible à une phosphorylation par CaMKII [413].

D'autre part, une équipe a identifié un rôle pour CaMKII dans l'apoptose des CEs induite par une forte concentration de glucose [414]. Cette étude montre qu'en présence de KN-93, le niveau d'apoptose des CEs est significativement diminué alors qu'en présence d'une forte concentration de glucose le niveau de CaMKII active (phosphorylée) est augmenté. Le mécanisme expliquant ce phénomène implique les mitochondries, puisque le glucose à forte

concentration augmente le potentiel membranaire des mitochondries ainsi que le niveau de cytochrome C cytoplasmique et qu'en présence de KN-93 ces paramètres sont diminués [414].

Dans les CMLVs et les cardiomyocytes, CaMKII est impliquée dans la régulation de l'homéostasie calcique en modulant principalement les pompes SERCA, le PLB ainsi que les canaux calciques de type L, mais également les IP<sub>3</sub>Rs [217, 390, 399, 415] Xu, 1993 #2865}[385-387]. L'équipe du Dr L.A. Blatter montre que trois inhibiteurs de CaMKII : KN-93, KN-62 et AIP, altèrent la phase plateau du signal calcique en réponse à l'ATP [416, 417]. Leurs différents travaux ont révélé que CaMKII dans les CE d'artères pulmonaires de veau phosphoryle les IP<sub>3</sub>Rs, ce qui diminuerait la probabilité d'ouverture du récepteur. En effet, une inhibition de CaMKII par le KN-93 stimule la libération du Ca<sup>2+</sup> des réserves intracellulaires, alors qu'une inhibition des IP<sub>3</sub>Rs par le 2-APB, réduit cette augmentation de 91%. D'un autre côté, CaMKII semble également moduler l'entrée capacitive de Ca<sup>2+</sup>, évoquant un rôle lors de la déplétion des réserves intracellulaires [416]. En conclusion, ces résultats suggèrent donc que CaMKII aurait un rôle inhibiteur sur les IP<sub>3</sub>Rs, ce qui permettrait le remplissage des réserves intracellulaires suite à une stimulation des CE.

Le Ca<sup>2+</sup> est évidemment crucial pour l'activation de CaMKII ainsi que pour les diverses fonctions endothéliales, dont la production de NO *via* la NOS3. La NOS3 requiert d'abord le Ca<sup>2+</sup> pour son activation, mais également des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation. Aujourd'hui, de nombreuses évidences montrent que CaMKII a la capacité de moduler l'activation et l'expression génique de NOS3 [152]. Les premières évidences d'une telle relation avaient initialement été démontrées dans le cerveau entre CaMKII et la NOS neuronale (NOS1) [418-420]. Le rôle de CaMKII dans les CE semble être primordial dans la stimulation de la production de NO. D'abord, le peptide inhibiteur CaM prévient la translocation vers le cytosol de la NOS3 membranaire suite à une stimulation à la Bk. Ensuite, en présence de KN-93 la production de NO mesurée dans le milieu de culture de CE d'artères pulmonaires est significativement réduite en réponse à l'ionophore calcique A23187 et l'inhibiteur des pompes ATPase, la thapsigargin [151]. Des essais enzymatiques ont montré une diminution d'environ 43% de l'activité de la NOS3 lorsque CaMKII est inhibée. Conjointement, la vasorelaxation induite par l'ACh ou l'ionophore calcique est également

atténuée en présence de KN-93 [151]. De plus amples études sur des extraits d'aortes de rat ou sur des HUVEC ont montré que la phosphorylation de NOS3 sur la Ser1177 par CaMKII est diminuée en présence de KN-93 [153, 421]. D'ailleurs, des études de mutagenèse ont montré que mimer une phosphorylation en Ser1177 augmente l'activité de la NOS3, alors qu'une mutation de la Ser1177 empêche l'activation de la NOS3 [149]. Enfin, Fleming et coll. ont révélé par immunoprécipitation que la Bk stimule l'association du complexe CaMKII/NOS3 dans les HUVEC [153]. Ces nombreux travaux permettent d'établir une relation directe entre CaMKII et l'activation de la NOS3 dans les CEs.

Outre l'activation par phosphorylation, CaMKII a également la capacité de moduler l'expression génique de NOS3. D'abord, il a été démontré que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimule l'expression de NOS3 dans les BAEC en culture [422]. De plus amples études ont permis de montrer que CaMKII est impliquée dans ce mécanisme de transcription génique. Des études d'immunofluorescence et d'essais enzymatiques ont montré une augmentation de la forme active de CaMKII (phosphorylée en Thr286) accompagnée d'une augmentation de son activité en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [152]. Une inhibition de CaMKII avec le KN-93 diminue de 77% l'expression de NOS3 en réponse à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [152]. Le même groupe a démontré que CaMKII et l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont également responsables de l'augmentation de l'expression de NOS3 par les contraintes de cisaillements oscillatoires, suggérant un rôle physiopathologique de cette voie de signalisation [423]. En effet, en condition pathologique les contraintes de cisaillements sont souvent associées à une augmentation de la production de ROS qui engendrerait le découplage de la NOS3 (voir chapitre 4 – La dysfonction endothéliale, page 76). Ainsi, lorsque NOS3 est découplée, son activation engendrera une plus grande production de ROS. Par conséquent, une augmentation de l'expression de NOS3 dans de telles conditions impliquerait CaMKII dans le développement de la dysfonction endothéliale. Enfin, l'histamine est un autre agoniste requérant CaMKII afin de stimuler l'expression de NOS3 dans les HUVEC [154]. En résumé, ces résultats révèlent une relation importante entre CaMKII et NOS3, qui demeure inexplorée dans les CEs d'artères fraîchement isolées.

Les études sur CaMKII endothéliales ont permis de révéler l'importance de cette enzyme dans les différentes fonctions endothéliales et suggèrent son rôle essentiel dans le maintien de



l'homéostasie vasculaire. Toutefois, l'étude au niveau d'artères fraîchement isolées demeure peu explorée. Il est intéressant de noter que la structure du vaisseau est cruciale pour le maintien de l'homéostasie vasculaire, puisqu'elle comprend entre autres les PMEs impliquées dans la régulation vasculaire. Il est bien établi que la localisation intracellulaire de CaMKII est importante pour les fonctions accomplies.

### **3.5 CaMKII et les pathologies vasculaires**

Le rôle de CaMKII dans certaines pathologies cardiaques telles que l'arythmie et l'insuffisance cardiaque est maintenant bien établi (revue de la littérature [329, 380, 424]). Cependant, peu d'études *in vivo* ont montré un lien direct entre CaMKII et le développement de pathologies vasculaires, plus particulièrement au niveau des CEs. Sachant que CaMKII a la capacité de répondre à des signaux calciques et aux ROS pour réguler différentes fonctions vasculaires, une altération des dynamiques calciques ou un déséquilibre redox pourraient engendrer une dysfonction de l'homéostasie vasculaire telle qu'observée dans certaines pathologies.

Les travaux de Yousif et coll. ont montré que CaMKII contribue au développement de la dysfonction vasculaire dans un modèle de rat diabétique [425-427]. Ce modèle pathologique possède un profil intéressant pour CaMKII. Il présente un niveau élevé de  $Ca^{2+}$  associé à une augmentation du tonus vasculaire, alors que CaMKII semble contribuer à la contraction vasculaire [338, 339, 428]. L'activité et l'expression de CaMKII semblent augmentées dans le cerveau de rats diabétiques [429]. Yousif et coll. ont démontré par des études de vasoréactivité sur des artères mésentériques canulées de rats diabétiques une altération des réponses vasoconstrictrices et vasodilatatrices en réponse à leurs différents agonistes respectifs (la norépinephrine; NE, l'ET-1 et l'AngII, ainsi que le carbachol, l'histamine et le nitroprussiate de sodium; SNP) [427]. Une infusion chronique de KN-93 révèle une amélioration de la réponse vasculaire aux agonistes, suggérant un rôle prépondérant pour CaMKII dans le développement de la dysfonction vasculaire dans ce modèle pathologique. Ces résultats ont également été reproduits dans l'artère rénale et la carotide isolée de rats diabétiques hypertendus [425, 426]. Enfin, une autre étude montre que CaMKII est également impliquée dans le développement de l'hypertension induite par l'AngII, puisqu'une infusion chronique

de KN-93 diminue de 29% la pression artérielle de ces animaux [340]. Dans ce modèle d'hypertension, l'activation de CaMKII semble augmenter dans les reins, mais ceci n'a pas été démontré au niveau des vaisseaux. Toutefois, l'étude morphologique des vaisseaux des animaux hypertendus montre une hyperplasie de la couche media, un épaississement de la paroi vasculaire ainsi qu'un rétrécissement de la lumière, qui sont atténués suite à une infusion de KN-93. D'ailleurs, Li et coll. ont démontré que l'inhibition de CaMKII par une infusion chronique de KN-93 réduit l'hypertrophie des CMLVs en plus de prévenir l'hypertension associée à une infusion chronique d'AngII [336].

D'autre part, une étude suggère que CaMKII joue un rôle dans la fonction endothéliale en étant impliquée dans la phosphorylation de NOS3, la production de NO ainsi que la relaxation aortique [421]. Une stimulation à l'ACh engendre une augmentation de la phosphorylation de NOS3 en Ser1177, un effet qui est aboli lorsque CaMKII est inhibée par le KN-93. D'un autre côté, l'étude montre plutôt que ces trois mécanismes sont perturbés chez le rat diabétique et que la diminution de la phosphorylation en Thr286 de CaMKII corrèle avec la dysfonction endothéliale. Ils ont également évalué la contribution de CaMKII dans la relaxation aortique induite par l'ACh. En présence de KN-93, la relaxation induite par l'ACh des segments d'aortes du groupe contrôle est significativement diminuée, alors que le groupe diabétique ne change pas. D'ailleurs, la relaxation altérée observée en présence de KN-93 dans le groupe contrôle est similaire à la réponse induite par l'ACh dans le groupe diabétique sans pré-incubation avec le KN-93. Les auteurs ont suggéré que la diminution de la phosphorylation de CaMKII et de la relaxation à l'ACh dans le groupe diabétique pourrait être le résultat d'une augmentation de la déphosphorylation de CaMKII par les protéines phosphatases PP1 $\alpha$  et PP2A. L'activité et l'expression de ces deux phosphatases sont augmentées dans ce modèle de rat diabétique. Enfin, contrairement aux études de Yousif et coll, cette étude montre que CaMKII est importante pour la fonction endothéliale et ainsi, pour l'homéostasie vasculaire.

Pour conclure, les études sur CaMKII vasculaire révèlent une implication importante de cette kinase dans diverses fonctions cellulaires tant au niveau des CEs que des CMLVs. Toutefois, de plus amples études sont nécessaires afin de comprendre l'implication directe de CaMKII dans les pathologies vasculaires. L'identification d'un nouveau mécanisme d'activation par

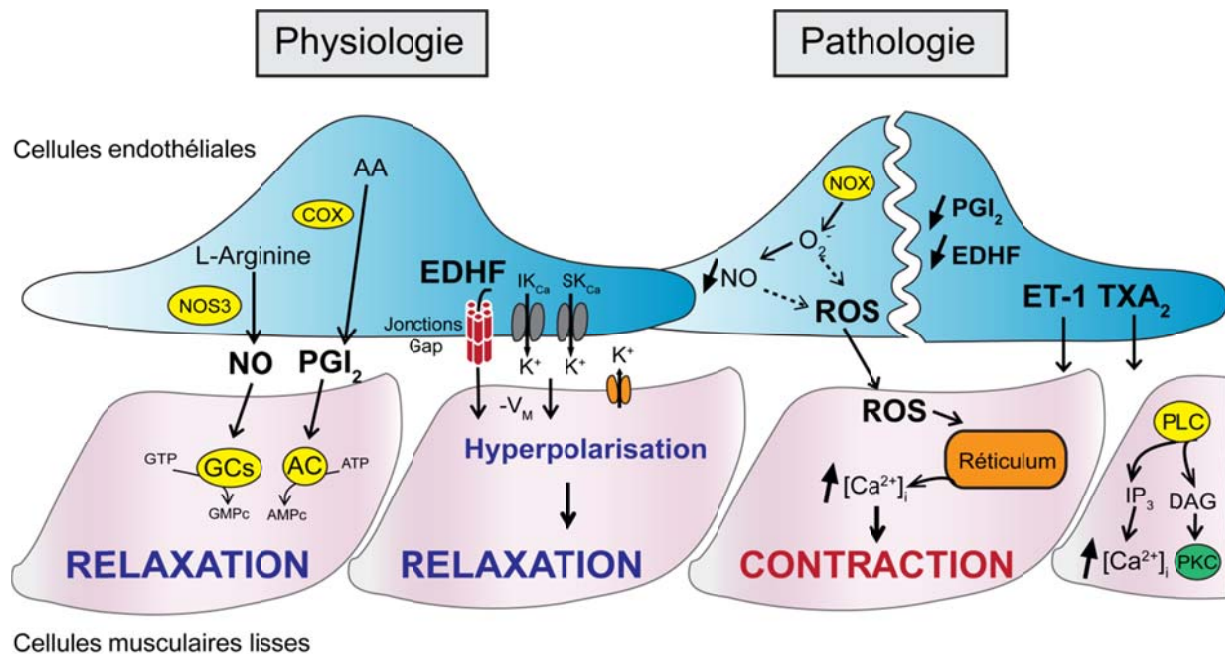
oxydation demeure à élucider au niveau vasculaire. De nombreuses études suggèrent que CaMKII est sensible à l'état redox de la cellule, puisque des évidences ont montré entre autres que CaMKII a la capacité d'être activée par  $H_2O_2$ . Par conséquent, en condition pathologique le stress oxydant pourrait activer CaMKII et ainsi l'impliquer dans la dysfonction vasculaire.

## Chapitre 4 – La dysfonction endothéliale

Il est bien établi que la fonction endothéliale est essentielle à l'homéostasie vasculaire. L'endothélium joue un rôle primordial dans la régulation du tonus vasculaire par le maintien de l'équilibre entre la relaxation et la contraction du muscle lisse sous-jacent *via* la synthèse et la libération de plusieurs facteurs vasoactifs (Figure 20, page 76). En contrepartie, une dysfonction endothéliale est caractérisée par une perturbation de cet équilibre manifestée par une diminution de la réponse dilatatrice dépendante de l'endothélium, favorisant ainsi un état vasoconstricteur (Figure 20, page 76). Une fonction anormale des CEs est déterminée par une diminution de la biodisponibilité des facteurs relaxants (NO, PGI<sub>2</sub>, EDHF) et/ou une augmentation des facteurs constricteurs (TXA<sub>2</sub>, ET-1, ROS, AngII, etc.). Ainsi, une diminution de la dilatation dépendante de l'endothélium est souvent associée à une diminution de la production du NO ou une augmentation de sa dégradation. Les ROS jouent également un rôle majeur dans la dysfonction endothéliale en perturbant différents mécanismes essentiels à l'homéostasie vasculaire. Les ROS vont réagir avec le NO, diminuant ainsi leur biodisponibilité en plus de stimuler la vasoconstriction. D'un autre côté, sachant que la synthèse et la libération des différents médiateurs responsables de la régulation du tonus vasculaire sont finement modulées par le Ca<sup>2+</sup>, il est essentiel de considérer l'impact d'une dyshoméostasie calcique dans la dysfonction endothéliale. La dysfonction endothéliale peut également être associée à une perturbation de l'hémostase révélée par un environnement pro-thrombotique, pro-coagulant et pro-inflammatoire, en plus de promouvoir la prolifération et la migration des CMLVs.

La dysfonction endothéliale représente un important facteur de risque pour différentes pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle, l'athérosclérose et le diabète [101, 132, 430]. Des études cliniques et expérimentales ont montré une corrélation directe entre la dysfonction endothéliale et l'hypertension [133, 431, 432]. De nombreux modèles expérimentaux d'hypertension artérielle ont permis d'approfondir nos connaissances sur les divers mécanismes cellulaires impliqués dans la dysfonction endothéliale et par conséquent, de développer des traitements adéquats (voir chapitre 5, page 94). Dans ces modèles d'hypertension, la diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium est la

conséquence d'une altération de l'homéostasie calcique, d'une réduction de la biodisponibilité du NO, d'une diminution de l'hyperpolarisation et de la relaxation par l'EDHF ainsi que d'une augmentation du stress oxydant et des composés vasoconstricteurs dérivés de l'endothélium (TXA<sub>2</sub>, ET-1, AngII).



**Figure 20. L'endothélium en physiopathologie.**

En condition physiologique, l'endothélium fonctionnel génère principalement le NO, la PGI<sub>2</sub> et l'EDHF afin d'assurer l'homéostasie vasculaire. À l'opposé, lors d'une dysfonction endothéliale, observée en condition pathologique telle que l'hypertension, les CE synthétisent principalement des facteurs contractants, ainsi que pro-thrombotiques et pro-inflammatoires (ROS, ET-1, TXA<sub>2</sub>). Ces facteurs peuvent agir à différents niveaux pour provoquer la contraction des CMLVs. Dans le muscle lisse, ces facteurs engendrent une augmentation du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, alors que dans les CE ils vont diminuer la biodisponibilité des facteurs vasodilatateurs.

AA : acide arachidonique, AC : adénylate cyclase, AMPc : adénosine monophosphate cyclique, ATP : adénosine triphosphate, Ca<sup>2+</sup> : calcium, COX : cyclooxygénase, DAG : diacylglycérol, EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium, ET-1 : endothéline-1, GCs : guanylate cyclase, GMPc : guanosine monophosphate, GTP : guanosine triphosphate, K<sub>Ca</sub>3.1 et K<sub>Ca</sub>2.3 : canaux potassiques dépendants du Ca<sup>2+</sup> de moyenne et de faible conductance, K<sup>+</sup> : potassium, NO : oxyde nitrique, NOS3 : NO synthase endothéliale, O<sub>2</sub><sup>-</sup> : superoxyde, PGI<sub>2</sub> : prostacycline, PKC : protéine kinase C, PLC : phospholipase C, ROS : espèces réactives à l'oxygène, TXA<sub>2</sub> : thromboxane A<sub>2</sub>.

## 4.1 Le stress oxydant vasculaire

Le stress oxydant est un élément inhérent à la dysfonction endothéliale [433]. Il est caractérisé comme étant une condition pro-oxydante dans laquelle une production accrue de ROS (O<sub>2</sub><sup>-</sup>,

$\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{ONOO}^\cdot$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ne peut être éliminée par les antioxydants (la SOD, la catalase et la glutathion peroxydase) afin de rétablir l'équilibre redox physiologique [434]. Bien que les ROS soient importantes dans la physiologie vasculaire en modulant le tonus vasculaire et la transcription des gènes, à long terme, un déséquilibre redox est associé à de nombreuses maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose, le diabète et l'hypertension. Les ROS sont responsables de l'oxydation de l'ADN, des protéines et des lipides, contribuant ainsi aux dommages cellulaires associés à la dysfonction endothéliale, la prolifération et la migration des CMLVs observés dans les différentes pathologies. Les mécanismes moléculaires par lesquels les ROS induisent des dommages vasculaires impliquent les voies de signalisations sensibles à l'état redox de la cellule. Au niveau vasculaire, les ROS ont des conséquences majeures dans la régulation du tonus vasculaire, favorisant un état vasoconstricteur par la diminution des effets des facteurs relaxants ( $\text{NO}$ ,  $\text{PGI}_2$  et EDHF) et par la stimulation de la synthèse de facteurs contractants tels que la  $\text{TXA}_2$ . Les ROS peuvent stimuler diverses protéines kinases (CaMKII, MAPK, tyrosine kinases, Rho kinase) et facteurs de transcription, en plus d'inactiver des tyrosines phosphatases [435]. D'autres part, elles peuvent altérer les dynamiques calciques des CEs et des CMLVs par leurs interactions avec les protéines responsables de l'homéostasie calcique. Enfin, il est important de noter que les ROS vont également engendrer une surface pro-thrombotique, augmenter la perméabilité vasculaire et stimuler la prolifération et la migration des CMLVs. Ainsi, les ROS sont impliquées dans de multiples pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle [133, 436]. L'augmentation des ROS a été démontrée dans divers modèles expérimentaux d'hypertension, dont celui induit par l'AngII. Ce modèle est très intéressant étant donné l'implication de l'AngII dans l'hypertension humaine *via* le système RAS (développé dans le chapitre 5, page 94) [436-439] (revue de la littérature [440]). Un taux élevé d'AngII est souvent un facteur contribuant à la dysfonction endothéliale [439]. L'AngII est un puissant facteur vasoconstricteur en plus d'être responsable de l'augmentation du stress oxydant en condition pathologique. De nombreuses études ont établi les conséquences d'une administration chronique d'AngII sur la fonction endothéliale ainsi que sa contribution à l'hypertension artérielle.

#### **4.1.1 Les sources endothéliales d'espèces réactives à l'oxygène**

Au niveau vasculaire, les sources de ROS sont la NADPH oxydase, les enzymes de la voie de l'acide arachidonique (les COXs, les lipoxygénases et les CYP450), les peroxydases, la xanthine oxydase, la NOS3 découplée ainsi que les enzymes mitochondriales. Malgré l'implication de ces enzymes dans la production des ROS, les principales sources associées à une dysfonction endothéliale dans diverses pathologies cardiovasculaires sont la NOS3 découplée et la NADPH oxydase [441, 442]. Il est toutefois important d'indiquer qu'en condition physiologique la mitochondrie est la principale source de ROS en ayant 1 à 2 % des électrons totaux traversant la chaîne respiratoire produisant l' $O_2^-$  et l' $H_2O_2$  [443].

#### **L'oxyde nitrique synthase endothéliale découplée**

En condition physiologique la NOS3 va synthétiser le NO. Toutefois, une perturbation dans le transfert d'électrons provoque la formation d' $O_2^-$  au détriment du NO. La NOS3 ainsi découplée est impliquée dans la dysfonction endothéliale en devenant une source importante de ROS et en diminuant la production de NO. De nombreuses études sur différents modèles expérimentaux ont rapporté la présence d'un découplage de la NOS3 contribuant à la formation des ROS dans la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension [444-446].

Divers mécanismes peuvent mener au découplage de la NOS3. Notamment, une déficience en substrat (L-arginine) ou en cofacteur ( $BH_4$ ) qui vont perturber le transfert d'électrons par la NOS3, produisant ainsi l' $O_2^-$ . De nombreuses études ont révélé une dysfonction endothéliale associée à une diminution du niveau de L-arginine et de  $BH_4$  dans plusieurs modèles pathologiques dont l'hypertension artérielle [445, 447-449]. La diminution de la L-arginine semble impliquer une augmentation de l'activité de l'arginase, catalysant l'hydrolyse de la L-arginine [448, 449]. Par ailleurs, l'oxydation du  $BH_4$  par l' $O_2^-$  et l' $ONOO^-$  contribue grandement à diminuer son niveau, participant ainsi à la dysfonction endothéliale [445, 450]. Il a été démontré qu'une administration de L-arginine ou de  $BH_4$  est capable de rectifier le découplage de la NOS3 et de diminuer la production d' $O_2^-$  dépendante de la NOS3 [451-454]. Des analogues de la L-arginine tels que l'ADMA (diméthyle-arginine asymétrique) et le L-NMMA (N(G)-monométhyle-L-arginine) sont reconnus comme des inhibiteurs compétitifs

endogènes de la NOS3 bloquant le site actif de l'enzyme, ce qui a pour effet de diminuer la production de NO [455, 456]. Des études cliniques sur des sujets hypertendus ont révélé une augmentation de la concentration d'ADMA qui semble corrélée avec la diminution de la production de NO [457, 458]. D'autre part, la dysfonction endothéliale est également associée à une diminution de la biodisponibilité du NO suite à une augmentation de la production de ROS intracellulaires. L' $O_2^-$  généré excessivement réagit rapidement avec le NO, formant ainsi l'ONOO<sup>-</sup> comme puissant facteur oxydant pouvant altérer les fonctions endothéliales. Une dysfonction endothéliale peut également être la conséquence directe d'une perturbation de l'expression de la NOS3. Toutefois, plusieurs études ont montré une augmentation de l'expression de la NOS3 en conditions pathologiques [459-461]. Ce paradoxe semble être la conséquence d'une augmentation de la production d' $H_2O_2$  qui a la capacité de stimuler l'expression de la NOS3 au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel [422]. L'augmentation de l'expression de la NOS3 peut donc être un mécanisme pour augmenter la production de NO. Cependant, vu la situation pathologique, la NOS3 découplée semble plutôt générer des ROS.

En résumé, le découplage de la NOS3 est un élément majeur dans la dysfonction endothéliale, favorisant ainsi un état vasoconstricteur par la diminution de la production et de la biodisponibilité du NO, ainsi que par l'augmentation de la production de ROS, particulièrement l' $O_2^-$  et l'ONOO<sup>-</sup> (pour une revue de la littérature [462]). Toutefois, de nombreux autres mécanismes sont impliqués dans l'augmentation de la production de ROS au niveau des CEs.

### **La NADPH oxydase**

La NADPH oxydase est un complexe enzymatique formé de protéines membranaires comprenant la sous-unité catalytique NOX2 (gp91<sup>phox</sup>), la p22<sup>phox</sup> et la protéine G Rap1A associées aux protéines cytosoliques p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> et Rac2. Des variants homologues de la NOX2, soit NOX1, NOX4 et NOX5 ont également été identifiés dans les CEs (revue de la littérature [463]). Le complexe permet le transfert d'électrons du NADPH à l' $O_2$ , générant ainsi l' $O_2^-$ . Généralement, l'expression et l'activité de la NADPH oxydase sont stimulées par divers agonistes tels que l'AngII, de nombreuses cytokines et les forces



mécaniques (les contraintes de cisaillements et l'étirement cyclique). Une augmentation de l'expression et de l'activation de la NADPH oxydase est souvent associée à une dysfonction endothéliale retrouvée dans diverses pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle [112, 437, 464, 465]. La NADPH oxydase est la source prédominante d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> dans une dysfonction endothéliale associée à l'hypertension [112, 439, 466, 467]. Une diminution de la réponse dilatatrice dépendante de l'endothélium a été corrélée avec l'augmentation de la production de ROS, qui est le résultat d'une stimulation de l'activité et de l'expression de la NADPH oxydase en hypertension [439, 440, 442, 465, 468]. D'autre part, des études sur des souris transgéniques surexprimant la NOX2 ont montré une augmentation de la pression artérielle ainsi qu'une dysfonction endothéliale exagérée en réponse à l'AngII [469]. Ces résultats suggèrent donc que l'augmentation des ROS par la NADPH oxydase participerait à l'augmentation de la pression artérielle. De plus, le niveau de l'ARNm d'une composante essentielle au complexe de la NADPH oxydase, soit la p22<sup>phox</sup>, est également augmenté dans le modèle d'hypertension à l'AngII [468]. Ces évidences suggèrent que la NADPH oxydase est la source principale de ROS en hypertension [470]. À l'opposé, un modèle de souris p47<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> ne produit pas de ROS en plus de ne pas développer d'hypertension suite à une administration chronique d'AngII [471]. Au niveau des CEs, l'AngII stimule l'activité de la NADPH oxydase principalement *via* l'activation des récepteurs AT<sub>1</sub>. En présence d'un inhibiteur des récepteurs AT<sub>1</sub>, le losartan, l'activation de la NADPH oxydase est significativement atténuée [466]. Par ailleurs, une inhibition de la NADPH oxydase par l'apocynine, ainsi qu'une administration d'antioxydants (vitamine C, E et analogues de la SOD) abolit la production de ROS et par conséquent diminue la pression artérielle dans des modèles expérimentaux [472-474]. En conclusion, toutes ces études ont démontré que la NADPH oxydase est intimement liée au stress oxydant retrouvé lors d'une dysfonction endothéliale associée à l'hypertension.

#### **4.1.2 Les dommages vasculaires du stress oxydant**

Au niveau vasculaire, une production accrue de ROS contribue à la dysfonction endothéliale en interagissant avec les différents facteurs vasoactifs synthétisés par l'endothélium et ainsi promouvoir un état vasoconstricteur [111, 475]. Dans la majorité des études, les ROS induisent une vasoconstriction en plus de diminuer la relaxation dépendante de l'endothélium

[476]. Les ROS vont non seulement diminuer la biodisponibilité du NO, mais également altérer la voie de l'EDHF et de la synthèse de PGI<sub>2</sub>. De nombreuses études ont montré un lien intime entre la dysfonction endothéliale associée aux ROS et l'hypertension. Les mécanismes d'action des ROS inclut l'oxydation, la nitrosylation et l'hydroxylation des groupements sulfhydryles ou aromatiques (tyrosine, tryptophane, guanine) de diverses protéines enzymatiques et canaux ioniques, ce qui a pour conséquence d'altérer leur activité [477]. Les canaux ioniques sont sensibles aux ROS par la présence de groupements tyrosine, cystéine et méthionine, importants dans la formation du pore. Par conséquent, leur interaction avec les ROS peut significativement modifier leur probabilité d'ouverture.

### **Diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium**

Au niveau des CEs, les ROS inhibent les trois principales voies de signalisation engendrant la vasodilatation : le NO, la PGI<sub>2</sub> et l'EDHF. Parmi les mécanismes altérant la vasodilatation dépendante de l'endothélium, la formation d'ONOO<sup>-</sup>, par la réaction entre l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et le NO, diminue directement la biodisponibilité du NO. Des études suggèrent que dans le modèle d'hypertension SHR, la dysfonction endothéliale est principalement attribuée à la production excessive de ROS plutôt qu'à une diminution de la production de NO [478]. D'ailleurs, la NOS3 découplée participe à la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension en contribuant à l'augmentation de la production de ROS [444-446].

L'ONOO<sup>-</sup> induit la nitrosylation d'un résidu tyrosine de la PGI<sub>2</sub> synthase, altérant ainsi la synthèse de PGI<sub>2</sub> dans les CEs [479-481]. En condition pathologique, l'inhibition de cette enzyme va promouvoir la voie de formation des eicosanoïdes contractants dérivés de l'acide arachidonique tels que la TXA<sub>2</sub> [479-481]. Similairement, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibe le CYP450 époxycgénase, ce qui a pour effet d'altérer la vasodilatation dépendante des EETs [482]. L'ONOO<sup>-</sup> peut également découpler la NOS3 en oxydant les atomes de soufre constituant le centre du dimère (zinc-thiolate, ZnS<sub>4</sub>) [483]. Des évidences ont montré qu'une inhibition de la NOS3, alors découplée, prévient l'inactivation de la PGI<sub>2</sub> synthase [484]. Par ailleurs, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> favorise la phosphorylation de la NOS3 sur le résidu Tyr657 *via* la protéine tyrosine kinase 2 (PYK2), ce qui prévient la production de NO [485]. De plus, une diminution du co-facteur BH<sub>4</sub> suite à son oxydation par les ROS est également un mécanisme important dans le

découplage de la NOS3 et ainsi, dans la dysfonction endothéliale. Une administration supplémentaire de BH<sub>4</sub> dans une telle condition rétablit la fonction endothéliale. Parmi les divers mécanismes délétères des ROS, l'inhibition de la SOD ainsi que d'autres mécanismes antioxydants sont aussi des cibles contribuant au stress oxydant [486]. Brièvement, dans les CMLVs, les ROS vont également inhiber la GCs, une cible du NO, diminuant ainsi la vasodilatation dépendante de l'endothélium [487, 488]. De plus, des études ont montré que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibe l'hyperpolarisation induite par l'activation NO-dépendante des canaux BK<sub>Ca</sub> des CMLVs [489].

Les ROS vont interagir dans la voie de l'EDHF en altérant l'hyperpolarisation transmise aux CMLVs par l'inhibition des canaux potassiques K<sub>Ca</sub>2.3 et K<sub>Ca</sub>3.1 [489-492]. La perturbation de l'hyperpolarisation et de la relaxation induite par l'EDHF a été démontrée dans divers modèles d'hypertension [181, 493-496]. Cette perturbation semble impliquer entre autres une diminution de l'expression des canaux K<sub>Ca</sub>2.3 ainsi qu'une diminution du courant potassique généré [492, 497]. Des études sur des souris déficientes en K<sub>Ca</sub>2.3 et/ou K<sub>Ca</sub>3.1 présentent une importante altération de l'EDHF accompagnée d'une augmentation de la pression artérielle [181]. Parmi les hypothèses émises quant au mécanisme impliqué dans l'altération de l'EDHF, l'une semble intégrer les ROS. De nombreuses évidences ont montré que l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> diminue la réponse dilatatrice induite par l'EDHF [491, 498-500]. Au niveau des CMLVs, l'inhibition des canaux potassiques K<sub>V</sub> et BK<sub>Ca</sub> suite à une altération de la cystéine responsable du mécanisme de sensibilité au Ca<sup>2+</sup> perturbe la réponse dilatatrice dépendante de l'endothélium [501-504]. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> généré dans les CE peut diffuser à travers la IEL et agir au niveau des CMLVs. Toutefois, en fonction du type et de la concentration de ROS, leurs effets peuvent varier selon le type de canal potassique (K<sub>ir</sub>, K<sub>ATP</sub>, K<sub>Ca</sub>, BK<sub>Ca</sub>) ainsi que le lit vasculaire (pour une revue de la littérature [505, 506]).

D'autres études suggèrent une relation entre les ROS et l'EDHF impliquant les jonctions communicantes gap. D'abord, des études ont montré une relation entre les connexines (Cx37, Cx40 et Cx43) des jonctions gap et l'hypertension [494, 507, 508]. Dans un modèle d'hypertension à l'AngII ainsi que dans un modèle SHR, il semble y avoir une diminution de l'expression des connexines qui est associée à une perturbation de l'EDHF [494, 507].

Toutefois, le mécanisme par lequel l'expression des connexines est diminuée reste à identifier. Sachant que les ROS sont augmentées en hypertension, il a été suggéré qu'elles seraient impliquées dans ce mécanisme d'altération. Des études d'électrophysiologie ont montré que des antioxydants (5-méthyltétrahydrofolate; 5-MTHF, (6R)-5,6,7,8-BH<sub>4</sub> ainsi que la catalase) préviennent l'altération de l'hyperpolarisation et de la communication entre les CEs et les CMLVs induite par les peptides mimétiques des connexines des jonctions gap (<sup>37,40</sup>Gap 26 et <sup>43</sup>Gap26) [509]. Cette relation est fondée sur le fait que les ROS peuvent favoriser les modifications post-traductionnelles des connexines. L'activation de la tyrosine kinase Src et des kinases sérine/thréonine (PKC, MAPK) ou l'inactivation des protéines tyrosine-phosphatases par les ROS peuvent moduler la (dé)phosphorylation des résidus de l'extrémité C-terminale cytoplasmique des connexines.

### **Stimulation de la vasoconstriction**

Outre l'altération de la voie du NO, de l'EDHF et de la PGI<sub>2</sub>, diminuant la réponse dilatatrice dépendante de l'endothélium, les ROS vont également stimuler la synthèse de facteurs vasoconstricteurs *via* les COXs en présence d'une dysfonction endothéliale [102, 127, 475, 510, 511]. Il est établi qu'en condition pathologique, la synthèse de PGI<sub>2</sub> est diminuée alors que celle d'agents vasoconstricteurs dérivés des COXs tels que la TXA<sub>2</sub> prédomine [512, 513]. Les prostanoides dérivés de la COX1 activant les récepteurs TP semblent être impliqués dans le modèle d'hypertension à l'AngII [513, 514]. Dans le modèle SHR, l'activation de la COX1 semble être à l'origine de la contraction dépendante de l'endothélium en réponse à l'ACh [101, 510]. Il est établi que les ROS sont augmentées lors d'une dysfonction endothéliale associée à l'hypertension. Le mécanisme suggéré est que les ROS favoriseraient la production de prostanoides contractants dérivés de l'acide arachidonique en activant les COXs des CEs et des CMLVs [101, 102, 104, 125-127]. En présence d'inhibiteurs des COXs (indométacine, diclofénac et valeryl salicylate) ou d'antagonistes des récepteurs TP (SQ29548, AH23848, R68.070), la contraction induite par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est significativement réduite [104, 125, 126, 510, 515]. Ce mécanisme semble impliquer la production de TXA<sub>2</sub> et d'isoprostanés (un autre métabolite dérivé de l'acide arachidonique) formés suite à la peroxydation lipidique, qui peuvent tous deux stimuler les récepteurs TP des CMLVs afin d'engendrer leur contraction [516-518]. D'autre part, les COXs ont la capacité de co-oxyder la NADPH oxydase, ce qui

engendre également la production d' $O_2^-$  [510, 513, 519, 520]. L' $O_2^-$  va rapidement se transformer en  $H_2O_2$  ou  $OH^\cdot$  pouvant diffuser vers les CMLVs afin de provoquer une vasoconstriction [104, 510]. Au niveau des CMLVs, les ROS sont responsables de la vasoconstriction en activant les récepteurs purinergiques, les canaux chlorures et en stimulant la voie ERK-MAPK et la PKC, mais également en augmentant le  $[Ca^{2+}]_i$  [521-524]. Les ROS vont également activer les COXs au niveau des CMLVs, générant encore plus de prostanoïdes contractants [480]. Pour résumer, en hypertension, les ROS généralement augmentées activent la COX1 endothéliale, ce qui engendre la production de prostanoïdes contractants et d' $O_2^-$  pouvant diffuser vers les CMLVs et activer les récepteurs TP afin d'induire la vasoconstriction.

Sous une autre perspective, l'impact des ROS sur le tonus vasculaire semble être contradictoire. En effet, certains ROS pouvant induire la vasoconstriction possèdent également des propriétés dilatatrices [525-527]. De nombreuses études ont démontré que l' $H_2O_2$  principalement peut provoquer la relaxation des CMLVs et la vasodilatation dépendamment de sa concentration, des conditions expérimentales ainsi que du lit vasculaire. Les premières études émettant l'hypothèse de propriétés dilatatrices des ROS ont d'abord démontré que dans les artères cérébrales, la dilatation dépendante de l'endothélium est sensible à la SOD et à la catalase [528]. Ensuite, de nombreuses études sur différents lits vasculaires tels que les artères coronariennes ont montré qu'en présence d'inhibiteurs de NOS et des COXs, la relaxation induite par un agoniste endothélial (ACh et Bk) ou par le débit est partiellement ou complètement sensible à la catalase [476, 529, 530]. D'ailleurs, certains travaux ont émis l'hypothèse que le mécanisme impliqué dans ce phénomène serait l' $H_2O_2$  diffusant vers les CMLVs en tant que composante de l'EDHF [527] (revue de la littérature [506]). Celle-ci se justifie par la capacité de l' $H_2O_2$  produit dans l'endothélium à induire une hyperpolarisation et une relaxation des CMLVs en activant entre autres les canaux potassiques  $Ca^{2+}$ -dépendants [122, 123] (revue de la littérature [506]). D'un autre côté, l' $H_2O_2$  stimule la libération du  $Ca^{2+}$  du RE, ce qui provoque une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  et subséquemment, l'activation des canaux  $K_{Ca2.3}$  et  $K_{Ca3.1}$  au niveau des CEs [531]. En présence des inhibiteurs des canaux potassiques, apamine et Tram-34, la relaxation dépendante de l'endothélium est abolie suite à une stimulation à l' $H_2O_2$  [531]. Toutefois, parmi les études effectuées sur l'impact des ROS

sur la relaxation dépendante de l'endothélium, de nombreux résultats ne semblent pas partager l'hypothèse que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  soit une composante de l'EDHF. En effet, plusieurs ne constatent pas d'inhibition de la relaxation en présence de catalase dans divers lits vasculaires (artères coronariennes et mésentériques, carotide et aorte) [532-534].

En résumé, l'impact des ROS sur le tonus vasculaire est sans équivoque un phénomène qui dépend du type et de la concentration des ROS en plus de varier selon le lit vasculaire. Néanmoins, la majorité des études supportent l'hypothèse que les ROS stimulent la vasoconstriction et diminuent la relaxation dépendante des facteurs vasodilatateurs de l'endothélium [101, 476].

### **Altération de l'homéostasie calcique endothéliale**

De nombreuses évidences ont montré qu'une altération de l'homéostasie calcique en présence de stress oxydant contribue à la dysfonction endothéliale. Une modification des protéines impliquées dans la régulation de l'homéostasie calcique peut induire des changements dans le profil spatiotemporel des signalisations calciques locales et globales. Une telle modification va altérer l'efficacité, la spécificité ainsi que la complexité de la transduction du signal calcique. Cette dyshoméostasie calcique pourrait avoir d'importantes implications dans les diverses pathologies cardiovasculaires compte tenu du rôle primordial du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans l'intégrité vasculaire.

Généralement, l' $\text{O}_2^-$  et l' $\text{H}_2\text{O}_2$  semblent augmenter le  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  tant au niveau des CEs que des CMLVs [535-539]. Toutefois, les résultats peuvent varier dépendamment du type et de la concentration de ROS. De plus, l'hétérogénéité du type vasculaire d'où proviennent les CEs ainsi que les conditions physiopathologiques sont des variables importantes. Des études ont montré qu'en présence de xanthine oxydase/hypoxanthine, l' $\text{O}_2^-$  généré engendre une hyperpolarisation transitoire de la membrane des CEs humaines [539]. Cette hyperpolarisation est le résultat d'une augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  qui débute par une libération rapide et transitoire du  $\text{Ca}^{2+}$  provenant des réserves intracellulaires suivie d'un influx constant de  $\text{Ca}^{2+}$  du milieu extracellulaire [539, 540]. L'augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  peut être inhibée en présence d'une activité accrue de la SOD et de la catalase, qui a pour effet d'inactiver l' $\text{O}_2^-$  et l' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

respectivement [539]. Cette augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  se compare à celle observée en réponse à des agonistes endothéliaux tels que l'AngII et la Bk généralement caractérisée par une signalisation calcique de type globale (définie dans le chapitre 2, page 25) [185, 186]. Néanmoins, à des concentrations plus faibles d' $O_2^-$ , le niveau de base du  $[Ca^{2+}]_i$  ne semble pas changer en présence de xanthine oxydase/hypoxanthine, alors qu'une stimulation par un agoniste (Bk ou ATP) semble l'augmenter [541]. La phase initiale représentée par une libération de  $Ca^{2+}$  des réserves intracellulaires ainsi que la seconde phase provenant du  $Ca^{2+}$  du milieu extracellulaire sont stimulées en présence d'un agoniste [541]. Brièvement, ces dynamiques calciques sont caractérisées par une augmentation de la production d' $IP_3$  ainsi qu'une augmentation de l'influx calcique suite à une déplétion des réserves intracellulaires [541]. D'un autre côté, des études ont montré que l' $H_2O_2$  a des effets opposés à l' $O_2^-$ . Il a été montré que l' $H_2O_2$  atténue le signal calcique en réponse à un agoniste par l'inhibition de la libération du  $Ca^{2+}$  des réserves intracellulaires et de l'influx calcique du milieu extracellulaire [542, 543]. Ces effets opposés semblent s'expliquer par l'utilisation d'une forte concentration d' $H_2O_2$ . L'étude de Hu et Coll. présente aucun effet sur le  $[Ca^{2+}]_i$  en présence d'une faible concentration d' $H_2O_2$  (1-10  $\mu M$ ) dans des CEs aortiques humaines [536]. Néanmoins, une concentration de 100  $\mu M$  d' $H_2O_2$  engendre une augmentation du niveau basal de  $[Ca^{2+}]_i$ , suivie d'une augmentation des oscillations calciques [536, 544]. Ces oscillations sont abolies suite à une déplétion des réserves intracellulaires sensibles à l' $IP_3$  [536]. D'autre part, des études sur les CMLVs ont également démontré que les ROS pouvaient engendrer une augmentation globale et locale du  $[Ca^{2+}]_i$  [535, 545-547]. Il a été démontré que l' $H_2O_2$  induit une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  dans les CMLVs de rats SHR [547]. D'autres évidences ont montré que les ROS stimulent les signalisations de types locales telles que les  $Ca^{2+}$  *sparklets* via l'activation des canaux calciques de type L [546, 548]. Toutefois, peu d'informations sont connues sur l'impact des ROS sur les cinétiques des différentes dynamiques calciques de types locales dans l'endothélium. Enfin, les ROS, soit l' $O_2^-$  et le  $H_2O_2$  à faible concentration, vont généralement augmenter les dynamiques calciques en réponse à un agoniste. Parmi les conséquences possibles d'une augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  induite par les ROS, une étude démontre une stimulation de l'activité de la NOS3 en présence d' $H_2O_2$  dans l'aorte de rat [549]. L'impact pathologique d'un déséquilibre dans la relation entre les ROS et le  $Ca^{2+}$  pourrait engendrer d'importantes perturbations dans la régulation du tonus vasculaire. La

capacité des ROS à moduler les dynamiques calciques pourrait être un élément majeur dans les pathologies vasculaires présentant un excès de ROS telles qu'en cas d'hypertension [547, 550, 551]. D'ailleurs, des études ont montré que les ROS perturbent l'homéostasie calcique en hypertension [547]. Sommairement, les effets des ROS sur les dynamiques calciques impliquent le  $\text{Ca}^{2+}$  des réserves intracellulaires et du milieu extracellulaire. Ces évidences suggèrent une interaction entre les ROS et les protéines responsables des différentes dynamiques calciques endothéliales.

Les protéines sensibles à l'état redox contiennent souvent des résidus de cystéines, tyrosines ou méthionines susceptibles d'être oxydés par les ROS [552]. Parmi les diverses protéines impliquées dans les signalisations calciques endothéliales, les  $\text{IP}_3\text{R}$ , les pompes PMCA et SERCA ainsi que les échangeurs NCX semblent tous être des cibles potentielles pour les ROS. Généralement, une modification de ces résidus peut engendrer une inactivation des pompes (SERCA et PMCA) ou stimuler l'activation des  $\text{IP}_3\text{R}$  ce qui résulte en une augmentation du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [113-117]. Tel que mentionné précédemment, de nombreuses études ont démontré une augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en présence de divers types de ROS. Certains rapportent une stimulation de la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  des réserves intracellulaires en présence d' $\text{O}_2^-$  dérivés de la NADPH oxydase ou d' $\text{H}_2\text{O}_2$  impliquant une interaction directe avec les  $\text{IP}_3\text{Rs}$  [531, 536, 553]. Cette interaction résulterait en une augmentation de la sensibilité des  $\text{IP}_3\text{Rs}$  à l' $\text{IP}_3$ , permettant possiblement l'activation des récepteurs à un niveau basal d' $\text{IP}_3$  [536, 554-556]. En présence d'une activité accrue de la SOD et de la catalase, l'augmentation du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  par l' $\text{H}_2\text{O}_2$  peut être évitée [539]. D'autres études suggèrent que l'ouverture des  $\text{IP}_3\text{Rs}$  peut également être modulée suite à l'oxydation des groupements thiols au niveau de l'extrémité C-terminale du récepteur [204]. D'un autre côté, les ROS ont la capacité de stimuler la production d' $\text{IP}_3$  en modulant soit l'activité ou l'association de la protéine G ou encore l'activité de la PLC, qui a pour conséquence d'augmenter le  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [541, 557, 558].

L'impact des ROS sur les pompes SERCA et PMCA ont également été le sujet de nombreuses études (revue de la littérature [118, 538, 559]. Les conclusions sur SERCA semblent toutefois contradictoires compte tenu des différences entre les isoformes et les concentrations utilisées de ROS ainsi que du nombre élevé de résidus de cystéines pouvant être modifiés par les ROS



[560]. Néanmoins, la majorité des résultats indiquent une inactivation des deux pompes en présence de ROS, engendrant ainsi une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  tant au niveau des CEs que des CMLVs [552, 561-564]. L'inactivation des pompes SERCA et PMCA résulte en une diminution de la recapture du  $Ca^{2+}$  vers les réserves intracellulaires ainsi que de son évacuation vers le milieu extracellulaire, respectivement. Il est à noter que les pompes PMCA semblent moins sensibles aux ROS comparativement aux pompes SERCA [559]. L'effet des ROS sur les échangeurs NCX s'avère controversé puisque certains suggèrent une augmentation de leur activité en présence d' $H_2O_2$ , tandis que d'autres ont montré le contraire [565, 566]. Dans une autre perspective,  $H_2O_2$  semble inhiber les échangeurs NCX mitochondriaux dans les CEs, ce qui réduit l'évacuation du  $Ca^{2+}$  des mitochondries et par conséquent augmente son contenu en  $Ca^{2+}$  [567]. Finalement, il est pertinent de noter que les ROS vont tout de même agir sur d'autres mécanismes et protéines pouvant altérer l'homéostasie calcique tels que le SOCE, les canaux TRPs [568-570], les RyRs, les VDCC, les kinases (CaMKII), etc. (pour une revue de la littérature [118, 538, 559]).

Il est évident que les ROS sont impliqués dans la modulation des dynamiques  $Ca^{2+}$  au niveau vasculaire. Néanmoins, de nombreuses évidences suggèrent également que le  $Ca^{2+}$  pourrait réguler la synthèse des ROS (revue de la littérature [118]). La mitochondrie est une source importante de ROS *via* la phosphorylation oxydative et le cycle de Krebs. Le  $Ca^{2+}$  est primordial pour l'activation des enzymes de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (NADH déshydrogénase, succinate déshydrogénase et ATP synthase) et du cycle de Krebs (pyruvate déshydrogénase, isocitrate déshydrogénase,  $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase) [266, 571, 572]. Ainsi, le  $Ca^{2+}$  est impliqué dans la production de ROS en activant le métabolisme. D'autre part, le  $Ca^{2+}$  est également un élément essentiel à la production de ROS *via* la NOX5 dépendante du  $Ca^{2+}$  [573-575]. La NOX5 est la seule isoforme ayant des motifs en main EF (*EF-hand*) sur l'extrémité N-terminale pouvant lier le  $Ca^{2+}$  [573, 576]. Cette liaison engendre un changement de conformation et l'activation de la NOX5, stimulant ainsi la production de ROS [576]. Récemment identifiée dans les CEs, NOX5 génère des ROS en réponse à divers stimuli tels que la thrombine, l'AngII, l'ET-1 et l'ionomycine, qui augmente le  $[Ca^{2+}]_i$  [577]. Des évidences suggèrent que NOX5 serait impliquée dans des maladies vasculaires étant donné l'augmentation de son expression et de son activation dans les artères coronariennes

athérosclérotiques [578]. Enfin, une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  dans les CEs semble également générer de l' $O_2^-$  *via* l'activation de la voie des COXs [511].

## 4.2 La dyshoméostasie calcique endothéliale

Dans le chapitre 2, nous avons discuté de l'importance qu'a l'homéostasie calcique sur les différentes fonctions endothéliales et particulièrement sur le contrôle du tonus vasculaire. Sachant que les mécanismes modulant les dynamiques calciques sont essentiels pour le maintien de cette homéostasie, une perturbation d'une de leurs composantes pourrait engendrer une dysfonction endothéliale. De nombreuses évidences suggèrent une relation entre les pathologies cardiovasculaires et la dysfonction endothéliale associée à une dyshoméostasie calcique [134, 135, 292] (revue de la littérature [131, 192]). En effet, une perturbation de l'homéostasie calcique endothéliale est associée à l'inflammation chronique, l'athérosclérose, le diabète et l'hypertension [228, 290-292, 579-581]. Considérant les nombreuses études effectuées sur les signalisations calciques globales, une corrélation directe a été établie avec les différentes maladies cardiovasculaires. Toutefois, peu d'informations sur la relation entre les signalisations calciques locales et les différentes pathologies cardiovasculaires ont été colligées. Cette section du chapitre portera principalement sur la relation entre la dyshoméostasie calcique et l'hypertension.

Il est bien établi qu'en hypertension la dysfonction endothéliale est associée à une perturbation de la vasodilatation dépendante de l'endothélium en réponse à un agoniste [431, 432, 582]. Chez les patient hypertendus, cette perturbation semble être associée à une altération de la voie de signalisation de l' $IP_3/Ca^{2+}$ , qui compromet la synthèse de NO dépendante du  $Ca^{2+}$  [431]. Par ailleurs, il a été démontré que dans l'aorte de rat SHR il y a une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  endothélial ainsi que de l'amplitude de la contraction dépendante de l'endothélium en réponse à l'ACh comparativement aux rats WKY [519, 583-585]. De plus, l'ionophore calcique A-23187 induit une réponse constrictrice similaire à l'ACh en stimulant la libération de  $PGI_2$  et de  $TXA_2$  dérivés de l'endothélium [584]. Ces études suggèrent qu'en hypertension, une dysfonction endothéliale est associée à une augmentation du  $[Ca^{2+}]_i$  ce qui stimule la contraction plutôt que la dilatation dépendante de l'endothélium. Cette réponse paradoxale, puisqu'à priori une augmentation globale du  $[Ca^{2+}]_i$  endothélial induit une relaxation des

CMLVs, semble impliquer une production de  $\text{PGI}_2$  significativement supérieure chez les rats SHR comparativement aux rats WKY [295, 519, 583, 584]. La production de  $\text{PGI}_2$  induit généralement une dilatation dépendante de l'endothélium suite à l'activation de ses récepteurs IP des CMLVs [586]. Les rats SHR et WKY semblent n'exprimer qu'à de faibles niveaux les récepteurs IP et en conséquence, ni la  $\text{PGI}_2$  ni son analogue (iloprost) réussissent à provoquer la relaxation [583, 587, 588]. Toutefois, la  $\text{PGI}_2$  peut également activer les récepteurs TP induisant ainsi la contraction dépendante de l'endothélium, phénomène exacerbé chez les rats SHR [583]. D'ailleurs, l'ACh provoque une contraction induite par les facteurs contractants dérivés de l'endothélium lors d'une dysfonction endothéliale chez les SHR [585]. Ce phénomène pourrait être expliqué selon deux hypothèses : l'hypertension induit la dysfonction endothéliale ou plutôt que la dysfonction endothéliale mène à l'hypertension. Des évidences ont montré que les deux hypothèses pourraient être valables. La dysfonction endothéliale est présente dans diverses pathologies cardiovasculaires, alors qu'elle peut également être subséquente au développement de l'hypertension.

D'autre part, une altération des composantes majeures de l'homéostasie calcique endothéliale telles que les TRPs, SERCA et les  $\text{IP}_3\text{Rs}$ , a également été intimement associée à l'hypertension [134, 228, 589, 590]. Mountian et coll. ont révélé que dans les CEs isolées de l'aorte de rat SHR, l'expression de SERCA3 et d' $\text{IP}_3\text{R2}$  sont augmentés comparativement aux WKY [589]. Il est intéressant de noter que SERCA3 est l'isoforme avec la plus faible affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  et le plus résistant aux ROS comparativement à SERCA2, alors que l' $\text{IP}_3\text{R2}$  est celui avec la plus grande affinité à l' $\text{IP}_3$  [201, 202, 591]. Par conséquent, il est possible d'émettre l'hypothèse qu'en hypertension, le  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  endothélial semble augmenter, particulièrement en réponse à des agonistes. D'autres évidences ont montré une augmentation de l'expression protéique des TRPC3 dans les SHR [592]. Thilo et coll. ont démontré qu'une augmentation des TRPC3 était associée à la pathologie d'hypertension dans les CEs chez l'humain [134]. Toutefois, le mécanisme par lequel l'influx calcique provenant des TRPC3 endothéliaux modulerait la vasoconstriction reste inconnu. Thilo et coll. suggèrent que l'influx calcique stimulerait la libération de facteurs vasoconstricteurs dépendants du  $\text{Ca}^{2+}$  tels que l'ET-1 ou l'acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque (20-HETE; synthétisé par le CYP450 à partir de l'acide arachidonique) [134]. Cette hypothèse concorderait avec les résultats discutés dans

le sous-chapitre 4.1.2 (Stimulation de la vasoconstriction, page 84) montrant une augmentation de la production des prostanoïdes contractants dérivés de l'endothélium.

En contrepartie, des études sur des CEs aortiques en culture de souris *SERCA3<sup>-/-</sup>* ont montré une diminution de la réponse calcique et de la relaxation dépendante de l'endothélium suite à une stimulation à l'ACh [242]. De plus, les souris *TRPC6<sup>-/-</sup>* semble développer une pression artérielle plus élevée comparativement aux souris contrôles [593]. Des études sur des artères mésentériques de souris *TRPV4<sup>-/-</sup>* ont montré également une altération importante de l'hyperpolarisation des CMLVs et de la vasodilatation subséquente en réponse à l'ACh [93, 99]. L'influx calcique *via* les *TRPV4*, également nommé *TRPV4-sparklets*, active les canaux *K<sub>Ca</sub>3.1* dans les CEs, engendrant une hyperpolarisation qui est ensuite transmise aux CMLVs afin d'induire une vasodilatation en inactivant les canaux VDCC [42]. Peu d'études ont montré une corrélation directe entre une altération des signalisations calciques locales et les pathologies cardiovasculaires. Cependant, l'équipe de Mark Nelson est la seule à avoir récemment émis une première évidence montrant une altération des *TRPV4-sparklets* dans un modèle de souris hypertendues à l'AngII [228]. Cette étude montre pour une première fois l'importance de l'organisation spatiale des éléments impliqués dans ce type de signalisation au niveau des PMEs en condition pathologique. Ce modèle d'hypertension ne montre aucune altération de la localisation ou de la densité du courant émis par les canaux *TRPV4* et *K<sub>Ca</sub>3.1* au niveau de PMEs [228]. La communication entre les CEs et les CMLVs semble également intacte, puisque la dilatation induite en réponse à un agoniste des canaux *K<sub>Ca</sub>2.3/K<sub>Ca</sub>3.1* (NS309) n'est pas perturbée dans les artères de souris hypertendues. Toutefois, l'étude montre que la localisation préférentielle d'AKAP150 dans les PMEs, qui est essentielle pour stimuler les *TRPV4-sparklets* et la vasodilatation dépendante de l'endothélium, est significativement diminuée en hypertension. Ce résultat explique la diminution des *TRPV4-sparklets* en réponse au carbachol (activateur des récepteurs ACh) ainsi qu'au GSK101 (agoniste des *TRPV4*) ainsi que la diminution de la dilatation dépendante de l'endothélium. Enfin, cette étude révèle l'importance des PMEs dans la fonction endothéliale ainsi que leur contribution dans les pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension.

En résumé, il est évident qu'une perturbation des éléments importants de l'homéostasie calcique est associée à une dysfonction endothéliale en diminuant la réponse dilatatrice dépendante de l'endothélium dans diverses pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle. Cette perturbation peut être la conséquence d'une augmentation de la production des facteurs contractant ou d'une diminution de la production des facteurs dilatateurs.

## Chapitre 5 – L’hypertension artérielle

Selon l’Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de mortalité à travers le monde. Parmi ces maladies, l’hypertension artérielle constitue l’un des facteurs de risque qui affecte 7,4 millions de personnes au Canada, soit environ 20% de la population. L’hypertension est un facteur de risque majeur pour les troubles cardiaques et vasculaires (l’angine de poitrine, l’infarctus du myocarde, les AVCs ou encore l’athérosclérose), l’insuffisance cardiaque, les arythmies, ainsi que les maladies rénales. Néanmoins, l’hypertension artérielle est également considérée comme une pathologie en soi. Une hypertension peut mener à un remodelage aux niveaux cardiaque et vasculaire ce qui entraîne une surcharge de travail pour le cœur conduisant à une hypertrophie du ventricule gauche et par conséquent au développement d’une insuffisance cardiaque. Une atteinte des vaisseaux au niveau rénal, alors sclérosés, mène à l’insuffisance rénale tandis que l’athérosclérose au niveau cérébral augmente les risques d’AVCs. De plus, l’hypertension est intimement associée à la dysfonction endothéliale telle qu’établie dans le chapitre précédent. De nombreuses études chez l’humain et dans divers modèles animaux d’hypertension ont montré une perturbation de la régulation du tonus vasculaire principalement caractérisée par une diminution de la vasodilatation dépendante de l’endothélium, une augmentation de la contraction dépendante de l’endothélium ainsi qu’une augmentation du stress oxydant.

L’hypertension est définie par une augmentation de la résistance périphérique totale lorsque le débit cardiaque est normal ou diminué. Elle consiste en une pression artérielle élevée définie par la force qu’exerce la circulation sanguine sur les artères. La haute pression artérielle est caractérisée par une mesure égale ou supérieure à 140 mmHg pour la pression systolique et 90 mmHg pour la diastolique, alors que la pression normale est de 120/80 mmHg. Les principaux facteurs déterminants la pression artérielle sont le débit cardiaque et la résistance périphérique. Le débit représente le volume de sang expulsé par le cœur (ventricule gauche) multiplié par le nombre de battements cardiaques par minute. Quant à la résistance périphérique, elle se définit par la force qui s’oppose à l’écoulement du sang dans les vaisseaux, résultant de la friction du sang sur les parois vasculaires. Parmi les différentes classes d’hypertension, celle dite essentielle (ou primaire) compte pour environ 90% des cas et est associée à divers facteurs de

risques tels que l'âge, l'hérédité et les habitudes de vie. Par conséquent, l'obésité, le diabète, la sédentarité, le tabagisme, une alimentation riche en sel, un abus d'alcool et le stress contribuent au risque de développer une pathologie d'hypertension. D'un autre côté, l'hypertension secondaire est causée par une pathologie telle qu'un problème rénal ou endocrinien ou encore une anomalie congénitale de l'aorte.

En condition physiologique, l'organisme possède plusieurs mécanismes pouvant réguler la pression artérielle en modulant la fréquence cardiaque, les volumes systolique et sanguin ainsi que la résistance périphérique. Le système nerveux autonome a la capacité de changer rapidement la pression artérielle et la fréquence cardiaque. La libération de facteurs neuro-humoraux (adrénaline, noradrénaline, l'hormone antidiurétique, etc.) et de dérivés vasoactifs de l'endothélium (NO et ET-1) permet de moduler finement la pression artérielle en agissant sur le cœur ou sur les vaisseaux. Le tonus myogénique, qui est une propriété intrinsèque des CMLVs, permet d'ajuster le diamètre des vaisseaux sanguins indépendamment du système nerveux. L'endothélium vasculaire a la capacité de moduler le tonus myogénique. Le rein est un élément primordial dans le contrôle de la pression en maintenant un volume et une composition ionique adéquats des fluides corporels, mais également en synthétisant la rénine. Cette libération de rénine est l'élément déclencheur du système RAS, qui a pour principal effecteur, l'AngII, jouant un rôle clé dans l'homéostasie cardiovasculaire.

En hypertension, les mécanismes régulateurs de la pression sont altérés. Parmi les divers mécanismes de nombreuses études ont montré une association importante entre la dysfonction endothéliale et la pathologie de l'hypertension (détaillé dans le chapitre 4, page 76) [594, 595]. Une altération de la relaxation dépendante de l'endothélium associée à une perturbation de la balance entre les ROS et le NO est observée dans des modèles animaux d'hypertension ainsi que chez les patients hypertendus [133, 431, 432, 596-598]. Le RAS est également un élément majeur impliqué dans la pathologie de l'hypertension.

## **5.1 Le système rénine angiotensine (RAS)**

Le RAS est important pour le maintien de l'homéostasie cardiovasculaire avec comme principal effecteur l'AngII. L'AngII est impliquée dans la régulation du tonus vasculaire, de

l'homéostasie hydrosodée, de la sécrétion d'aldostérone et de l'hormone antidiurétique, en plus, de stimuler le système nerveux sympathique et la contractilité cardiaque. Une stimulation chronique du RAS et de la libération d'AngII sont impliquées dans diverses pathologies cardiovasculaires dont l'hypertension, le diabète, l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde et les maladies rénales. L'usage d'agents pharmacologiques inhibant diverses composantes du RAS ou des cibles impliquées dans ce système montre une amélioration de la fonction endothéliale et une diminution de la morbidité et de la mortalité par l'hypertension chez l'humain [599, 600]. Le RAS agit comme un système endocrinien, mais également de façon locale, selon un mode paracrine ou autocrine au niveau des tissus et des organes tels que le cœur, les reins, le cerveau et les vaisseaux sanguins [601-603]. Le système vasculaire synthétise l'AngII de façon locale à la surface des CEs, mais également à l'intérieur de la cellule. Ainsi, AngII vasculaire peut agir de façon paracrine ou autocrine et finement moduler l'homéostasie tissulaire [601, 603, 604]. Le système RAS consiste tout d'abord par la sécrétion de rénine exclusivement synthétisée par les cellules juxtaglomérulaires rénales en réponse à des agonistes  $\beta$ -adrénergiques, une chute de la concentration plasmatique en sodium ainsi qu'une diminution de la pression rénale. La rénine va induire un clivage enzymatique de l'angiotensinogène en AngI circulante. La synthèse et la libération d'angiotensinogène se fait principalement par le foie, mais le cœur, le cerveau, les reins, les vaisseaux et les adipocytes semblent également en produire. Ensuite, AngI est convertie en AngII *via* ACE au niveau de différents tissus et organes. D'ailleurs, l'ACE présente au niveau des CEs va permettre la formation d'AngII de façon locale, pouvant ainsi stimuler les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> à proximité et réguler le tonus vasculaire [605-607]. AngII peut également être synthétisée à l'aide de la chymase et d'autres enzymes qui transforment directement l'angiotensinogène en AngII [608]. Enfin, la biosynthèse des peptides AngIII et IV à partir de l'AngII contribue aussi au contrôle du tonus vasculaire en agissant sur les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>, mais également sur les récepteurs AT<sub>4</sub> spécifiques à AngIV. AngIII semble lier les récepteurs de l'AngII avec la même affinité et engendrer les mêmes effets. D'autre part, AngIV possède des propriétés vasodilatatrices en activant les récepteurs AT<sub>4</sub> exprimés dans divers tissus (cœur, cerveau, reins et vaisseaux). Quant au peptide Ang-(1-7), il est transformé par l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) à partir d'AngI ou AngII [609, 610]. De nombreuses évidences suggèrent qu'Ang-(1-7) contraint les effets d'AngII en ayant plutôt un effet vasodilatateur,



dépresseur et antihypertenseur sur les SHR *via* son récepteur AT<sub>1-7</sub> [611, 612]. Ce peptide semble stimuler la synthèse et la libération de PGI<sub>2</sub> et de NO ainsi que potentialiser la vasodilatation en réponse à la Bk [612-614]. Enfin, les effets physiopathologiques du RAS sont plus souvent associés à l'AngII *via* l'activation des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>. De nombreuses études ont montré qu'une infusion chronique d'AngII engendre l'hypertension artérielle dans divers modèles animaux. D'un autre côté, des bloqueurs des récepteurs AT<sub>1</sub> à l'AngII (ARBs) et des inhibiteurs de l'ACE diminuent la pression artérielle chez les patients hypertendus [615]. L'augmentation du niveau d'AngII est impliquée dans la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension, qui est causée par une augmentation de la production de ROS et une diminution de la biodisponibilité du NO [133, 431, 432, 439]. Outre la capacité de réguler la pression artérielle, AngII joue un rôle important dans l'inflammation en stimulant le stress oxydant, l'expression de molécules d'adhésion et de cytokines inflammatoires. Une relation a été établie entre l'infusion chronique d'AngII et l'augmentation de l'athérosclérose chez les souris n'exprimant plus l'apolipoprotéine E (ApoE<sup>-/-</sup>). De plus, par l'activation des récepteurs AT<sub>1</sub>, AngII stimule la migration et la prolifération des CMLVs impliquées dans le remodelage vasculaire associé à l'athérosclérose, mais également à l'aggravation de l'hypertension. D'autre part, des effets bénéfiques tels que la stimulation de la production du NO ont été attribués à l'activation des récepteurs AT<sub>2</sub> de l'AngII et semblent être une cible thérapeutique importante. Ces effets bénéfiques semblent rétablir la fonction endothéliale en hypertension.

### **5.1.1 Les récepteurs à l'angiotensine II**

Les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> de l'AngII font partis de la famille des GPCRs [616]. Ils diffèrent selon leur distribution, leur affinité à l'AngII, leurs voies de signalisations ainsi que leurs effets physiologiques. Au niveau vasculaire, les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> sont exprimés sur la membrane des CEs, alors que les CMLVs expriment uniquement AT<sub>1</sub> [617, 618]. Il a été démontré que l'affinité des récepteurs à l'AngII diffère avec une liaison préférentielle de l'AngII au récepteur AT<sub>2</sub>. Toutefois, une étude a montré par RT-PCR que le ratio des ARNm AT<sub>1</sub>/AT<sub>2</sub> dans les CEs semble être approximativement de 4 :1 [617]. De nombreuses études ont montré que les principaux effets physiopathologiques attribués à l'AngII sont engendrés suite à l'activation des récepteurs AT<sub>1</sub>.

## Les récepteurs AT<sub>1</sub>

L'expression des récepteurs AT<sub>1</sub> a été démontrée dans plusieurs types de vaisseaux, le rein, les surrénales, le foie, le cerveau et le cœur. De nombreux effets biologiques tels que la régulation de la pression artérielle, la stimulation de la sécrétion d'aldostérone, la régulation du débit sanguin rénal, ainsi que régulation de la filtration glomérulaire et la réabsorption tubulaire ont clairement été établis et confirmés par divers modèles transgéniques [619, 620]. Au niveau vasculaire, AngII induit une vasoconstriction suite à l'activation des récepteurs AT<sub>1</sub> des CMLVs. La majorité des récepteurs AT<sub>1</sub> sont couplés à la protéine G<sub>q</sub>, ce qui engendre l'activation de la voie de signalisation de la PLC générant une augmentation d'IP<sub>3</sub> et de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> ainsi qu'une activation de la PKC. Dans les CMLVs, l'augmentation du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> engendre une contraction en activant les protéines sensibles au Ca<sup>2+</sup> responsables de la phosphorylation de la myosine [621]. Toutefois, les CE expriment également ces récepteurs à leur surface, pouvant ainsi contribuer à la vasoconstriction en situation pathologique. D'un autre côté, des études ont montré que AngII stimule la production d'acide arachidonique en activant la PLA<sub>2</sub> sensible au Ca<sup>2+</sup> et la PLC dans les CE [622]. Cette réponse est causée par l'activation des récepteurs AT<sub>1</sub>, puisqu'elle est complètement abolie en présence de DuP753, un inhibiteur des récepteurs AT<sub>1</sub> [622]. Dans les CE, l'augmentation de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> pourrait engendrer une stimulation de la production de NO. Certaines études sur des CE en culture ont montré une augmentation de la production de NO en présence d'AngII, suggérant un effet protecteur [623]. D'une part, Suzuki et coll. ont montré que la production de NO requiert la phosphorylation en Ser1179 de la NOS3 qui est dépendante de la sous-unité G<sub>q</sub> du récepteur AT<sub>1</sub> [624, 625]. En réponse à l'AngII, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endogène dérivé de la NADPH oxydase stimule la production de NO en activant la PI3 kinase qui par la suite phosphoryle la NOS3 [626, 627]. Cette augmentation est complètement abolie en présence de Losartan, un antagoniste du récepteur AT<sub>1</sub> [626]. Ces résultats supportent les études montrant qu'AngII potentialise la vasoconstriction d'artères isolées et dénudées de leur endothélium [628-630]. Toutefois, de nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont montré plutôt une relation directe entre l'infusion chronique d'AngII et la dysfonction endothéliale [439, 631, 632]. En effet, une infusion chronique d'AngII mène à de nombreuses pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension [470, 632-635]. Parmi les effets délétères suivant l'activation des récepteurs AT<sub>1</sub>, la production de ROS dérivées de la

NADPH oxydase contribue grandement à la dysfonction endothéliale [437, 438, 466, 471, 550]. Chez les patients hypertendus, il a été démontré que le RAS et les récepteurs AT<sub>1</sub> sont responsables de la stimulation de la production de ROS *via* la NADPH oxydase [470, 635]. Le modèle de souris p47<sup>phox</sup><sup>-/-</sup> ne produit pas de ROS et ne développe pas d'hypertension suite à une administration chronique d'AngII (voir chapitre 4 – La NADPH oxydase, page 80) [471]. De plus, l'infusion chronique d'AngII diminue la biodisponibilité du NO contrairement à une administration aigue d'AngII tel que décrit précédemment. Lors d'une dysfonction endothéliale causée par une infusion chronique d'AngII, la NOS3 peut être découplée, favorisant ainsi la production de ROS plutôt que de NO. Des études sur des CE en culture ont montré également une diminution de la biodisponibilité du NO causée par une augmentation des ROS *via* l'activation des récepteurs AT<sub>1</sub> [636]. L'utilisation d'antagonistes des récepteurs AT<sub>1</sub> ou d'inhibiteurs de la ACE améliore significativement la fonction endothéliale chez l'animal et l'humain en empêchant entre autres la production de ROS [637, 638]. AngII stimule également la production et l'expression de l'ARNm de l'ET-1 par la voie de signalisation ERK sensible aux ROS [639-641]. Outre la dysfonction endothéliale, AngII est également impliquée dans le processus d'inflammation (en augmentant l'expression des molécules d'adhésion intercellulaire et vasculaire (ICAM-1 et VCAM-1, respectivement), dans le remodelage cardiaque et vasculaire associée à l'athérosclérose (par l'hypertrophie et la prolifération des cellules), à l'insuffisance cardiaque et l'hypertension [642-644].

### **Les récepteurs AT<sub>2</sub>**

Il est reconnu que les principaux effets générés par l'AngII sont induits suite à l'activation des récepteurs AT<sub>1</sub> sachant que l'expression des récepteurs AT<sub>2</sub> est plutôt abondante au niveau du fœtus en développement. AT<sub>2</sub> joue un rôle essentiel dans le développement vasculaire fœtal et son expression diminue rapidement après la naissance [645, 646]. À l'âge adulte, AT<sub>2</sub> se trouve faiblement exprimé dans l'endothélium vasculaire, les reins, les surrénales, l'utérus, les ovaires, le cœur et le cerveau [616, 646, 647]. Toutefois, de nombreuses études ont démontré un rôle bénéfique des récepteurs AT<sub>2</sub> en conditions pathologiques telles que l'hypertension, l'athérosclérose, l'insuffisance cardiaque, l'infarctus du myocarde et le diabète associées à la dysfonction endothéliale, au remodelage tissulaire ou à l'inflammation [128, 129]. L'expression d'AT<sub>2</sub> semble augmenter dans les différentes pathologies ainsi qu'en présence de

diverses hormones, cytokines et facteurs métaboliques. Les effets physiopathologiques de l'activation des récepteurs AT<sub>2</sub> par l'AngII sont beaucoup moins établis que ceux d'AT<sub>1</sub>, mais semblent être plutôt protecteur pour le système cardiovasculaire. Des études sur des modèles animaux transgéniques et *knock-out* ainsi que des modèles cellulaires ont montré que certains effets d'AT<sub>2</sub> contrebalancent les effets délétères d'AT<sub>1</sub> [648-652]. Au niveau vasculaire, l'activation des récepteurs AT<sub>2</sub> stimule la vasodilatation ainsi que l'apoptose et inhibe la prolifération et l'hypertrophie des CMLVs [650, 653, 654]. Il a été démontré qu'une suppression du gène du récepteur AT<sub>2</sub> est associée à une augmentation de la pression artérielle avec une augmentation de la réponse vasoconstrictrice à l'AngII [648, 649, 655]. D'un autre côté, des patients diabétiques hypertendus traités avec le valsartan, un bloqueur des récepteurs AT<sub>1</sub>, ont montré une surexpression d'AT<sub>2</sub> associée à une diminution de la pression artérielle [656]. De plus, des évidences ont montré qu'une stimulation des récepteurs AT<sub>2</sub> diminue la pression artérielle chez les rats normotendus et hypertendus en présence de bloqueurs des récepteurs AT<sub>1</sub> [657, 658].

L'activation des récepteurs AT<sub>2</sub> couplés à une protéine G (G<sub>i</sub>) engendre principalement trois voies de signalisations opposant celles des récepteurs AT<sub>1</sub>. Tout d'abord, il est bien établi qu'une stimulation d'AT<sub>2</sub> au niveau de l'endothélium vasculaire induit une vasodilatation dépendante de la production de NO qui peut prévenir la dysfonction endothéliale [618, 659-661]. Une élimination de l'endothélium abolit la réponse dilatatrice dépendante d'AT<sub>2</sub> dans les artères coronariennes [628]. Cette voie de signalisation implique une stimulation de la Bk et de son récepteur B<sub>2</sub> ainsi qu'une activation de la NOS3 *via* la voie de la PKA [662]. L'inhibition d'AT<sub>2</sub> ou des récepteurs B<sub>2</sub> avec le PD123319 et icatibant respectivement, abolit l'augmentation de la production de NO/cGMP et de la phosphorylation (activation) de la NOS3 en réponse à l'AngII [662]. Des études sur des souris n'exprimant plus les récepteurs AT<sub>2</sub> (AT<sub>2</sub><sup>-/-</sup>) ont montré que B<sub>2</sub> requiert des récepteurs AT<sub>2</sub> fonctionnels afin d'induire une vasodilatation dépendante du débit, suggérant une hétérodimérisation des deux récepteurs pour stimuler la production de NO [663, 664]. D'un autre côté, certains suggèrent que l'augmentation du NO peut être indépendante de B<sub>2</sub> en activant la NOS3 directement [665]. En présence de l'inhibiteur de la NOS3 (L-NMMA), la vasodilatation induite suite à l'activation des récepteurs AT<sub>2</sub> est également abolie [628, 660, 666]. Enfin, une stimulation

des récepteurs AT<sub>2</sub> diminue la contraction induite suite à l'activation des récepteurs AT<sub>1</sub> principalement *via* la production de NO. Ceci suggèrent un rôle prépondérant d'AT<sub>2</sub> dans la prévention et l'amélioration de la dysfonction endothéliale en contrant les effets pathologiques associés à AT<sub>1</sub> [667-669]. Outre la production de NO, une stimulation des récepteurs AT<sub>2</sub> engendre une activation des protéines phosphatases (MAPK phosphatase, PP2A et SHP-1 tyrosine phosphatase) opposant la phosphorylation de protéines induites par les kinases activées *via* les récepteurs AT<sub>1</sub>. Par conséquent, cette voie de signalisation a des effets anti-inflammatoires, anti-prolifératifs, anti-hypertrophiques et pro-apoptotiques [670] (revue de la littérature [671, 672]. La troisième voie de signalisation induite par l'activation d'AT<sub>2</sub> implique l'activation de la PLA<sub>2</sub>, stimulant la production d'acide arachidonique. Des évidences ont montré que cette voie pourrait moduler les canaux potassiques menant à l'hyperpolarisation des cellules neuronales [673-675]. Toutefois, ce type de signalisation n'a pas encore été établie au niveau des CE vasculaires.

## **5.2 Les traitements contre l'hypertension artérielle**

La prise en charge de l'hypertension artérielle est essentielle afin de prévenir les maladies cardiovasculaires telles que les AVCs, l'athérosclérose et les maladies cardiaques et ainsi prolonger l'espérance de vie d'un patient. Un changement de mode de vie est primordial et fait partie des recommandations de première ligne lorsqu'un patient présente des signes d'hypertension artérielle. Par exemple, il est conseillé de limiter la consommation d'alcool (2 boissons par jour pour les femmes et 3 pour les hommes), d'arrêter de fumer, de diminuer la consommation de sel, de perdre du poids (diminue le risque d'hypercholestérolémie, dyslipidémie, diabète et obésité), d'améliorer son alimentation (davantage de fruits, légumes, céréales et fibres alimentaires) et de pratiquer régulièrement une activité physique. Les progrès scientifiques ont permis de mieux comprendre les éléments impliqués dans la pathologie de l'hypertension et ont ainsi mené au développement de nombreux traitements médicamenteux adaptés aux patients. Les médicaments agissant sur le RAS incluent les inhibiteurs de ACE (par exemple, le ramipril, l'énalapril, le lisinopril) diminuant la concentration circulante d'AngII, les ARBs (par exemple, le losartan, le valsartan) empêchant la vasoconstriction artérielle et les inhibiteurs de la rénine (aliskirène). De nombreuses études cliniques ont

démontré que l'effet des inhibiteurs de ACE et des ARBs permet de rétablir la fonction endothéliale, diminuer la pression artérielle et ainsi réduire les risques de maladies cardiovasculaires [599, 615, 634, 676, 677]. D'autre part, certains suggèrent qu'un agoniste des récepteurs  $AT_2$  (C21, CGP42112A) en combinaison avec les antagonistes d' $AT_1$  engendrerait des effets bénéfiques supérieurs à ceux engendrés par l'administration des ARBs seulement [130, 671]. De nombreux autres médicaments impliqués dans différents systèmes permettent également de diminuer la pression artérielle dépendamment du profil du patient, qui est souvent complexe. En effet, il est primordial d'avoir une large gamme de médicaments agissant sur les diverses cibles pharmacologiques impliquées dans l'hypertension puisqu'elle est généralement associée à plusieurs autres pathologies vasculaires. Les diurétiques (hydrochlorothiazide) agissent sur les reins afin d'augmenter le volume d'élimination d'eau et de sel. Les bêtabloquants (aténolol, métoprolol) agissent sur le cœur, les reins et les vaisseaux pour diminuer le tonus du système sympathique et la sécrétion de rénine, alors que les alpha-bloquants agissent principalement sur les artères. Les antagonistes des canaux calciques (nifédipine, amlodipine, vérapamil, diltiazem) diminuent la vasoconstriction et la fréquence cardiaque. On retrouve également les antihypertenseurs centraux qui agissent sur les récepteurs cérébraux du système sympathique, diminuant ainsi le tonus sympathique. Le choix du traitement va donc varier selon les différents facteurs de risque que présente le patient. Par exemple, un patient diabétique hypertendu ayant des problèmes cardiaques, recevra une médication différente d'un patient présentant une hypertension seule.

## Chapitre 6 – Mise en contexte de la thèse

L'endothélium vasculaire est une composante essentielle au maintien de l'homéostasie vasculaire. De nombreuses études ont associé la dysfonction endothéliale à différentes pathologies telles que l'hypertension. L'endothélium permet de maintenir l'intégrité vasculaire et la pression sanguine en modulant finement le tonus vasculaire. Les principaux mécanismes régulateurs impliquent la production et la libération d'agents vasodilatateurs (NO, PGI<sub>2</sub>, EGHF) et vasoconstricteurs (ET-1, TXA<sub>2</sub>, ROS) pouvant agir au niveau des CMLVs afin de moduler le diamètre des vaisseaux sanguins. Le point commun et majeur entre ces mécanismes régulateurs est la nécessité du Ca<sup>2+</sup> à différents niveaux, d'où l'importance d'une compréhension approfondie des dynamiques calciques endothéliales. Cependant, l'étude des dynamiques calciques dans l'endothélium d'artères intactes n'est que naissante.

De nombreuses études ont révélé l'importance de la structure des vaisseaux pour la communication entre les CEs et les CMLVs afin de moduler le tonus vasculaire. La présence de PMEs permet un échange intime de divers agents entre ces deux types cellulaires séparés par la IEL. Ces PMEs possèdent des voies de signalisations spécifiques pouvant moduler la contractilité des CMLVs sous-jacentes. Dans les artères mésentériques fraîchement isolées de souris, les pulsars calciques présents dans les PMEs semblent être impliqués dans le mécanisme de l'EDHF et ainsi moduler la contraction des CMLVs. Toutefois, l'étude des pulsars calciques dans d'autres lits vasculaires n'a toujours pas été explorée. L'existence d'une grande hétérogénéité dans la structure et les propriétés intrinsèques des différents lits vasculaires joue déjà un rôle important dans la fonction vasculaire. Les artères de gros calibres, dites de conductance, permettent un flux sanguin continu alors que les plus petites artères, dites de résistance, permettent de moduler la pression artérielle. Ces deux types de vaisseaux vont permettre d'assurer un apport sanguin de pression adéquate aux organes. D'un autre côté, des différences dans le nombre, la taille et la forme des PMEs ont également été rapportées selon le type de lit vasculaire sans toutefois connaître les raisons spécifiques de ces variations. Outre la structure de la IEL et des PMEs, peu d'informations sont connues sur les voies de signalisations restreintes dans ces PMES de différents lits vasculaires. Par conséquent, nous suggérons l'existence d'une diversité de la IEL, des PMEs ainsi que des

dynamiques calciques endothéliales associées entre les artères mésentériques, pulmonaires et coronariennes de petits et moyens calibres.

De nombreuses évidences ont révélé que la formation de PMEs regroupe un nombre important de protéines impliquées dans la fonction endothéliale. Les pulsars calciques sont caractérisés par une libération spontanée et oscillatoire de  $\text{Ca}^{2+}$  *via* les  $\text{IP}_3\text{Rs}$  localisés dans les PMEs. Ce type de signal calcique local semble être impliqué dans la régulation du tonus vasculaire en activant les canaux potassiques  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  présents dans les PMEs, ce qui résulte en une hyperpolarisation des CMLVs. Il est raisonnable de croire qu'il pourrait y avoir d'autres cibles potentielles sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  et préférentiellement localisées dans les PMEs, d'où l'intérêt d'étudier CaMKII. CaMKII, une enzyme dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , a la capacité de répondre à des signaux calciques similaires à la fréquence et aux cinétiques des pulsars calciques. Ces évidences nous amène donc à proposer que CaMKII endothéliale est activée par les pulsars calciques et engendre une réponse cellulaire importante pour la régulation du tonus vasculaire.

L'introduction de cette thèse nous a permis de mettre en évidence l'impact d'une dysfonction endothéliale dans les pathologies cardiovasculaires, particulièrement en hypertension artérielle. Parmi les nombreux mécanismes altérés, une dyshoméostasie calcique endothéliale est associée à la pathologie de l'hypertension. En effet, plusieurs protéines impliquées dans les mécanismes régulateurs du tonus vasculaire nécessitent le  $\text{Ca}^{2+}$  pour une exécution adéquate de leurs fonctions. Sachant que CaMKII pourrait être une cible potentielle des pulsars calciques, l'étude des signalisations calciques endothéliales en condition pathologique permettrait une meilleure compréhension des mécanismes régulateurs impliqués dans le contrôle du tonus vasculaire. Des études ont montré que CaMKII est impliquée dans la fonction endothéliale en modulant l'expression et l'activation de NOS3. D'un autre côté, des études pharmacologiques et l'utilisation d'animaux transgéniques ont permis de démontrer que CaMKII est impliquée dans diverses pathologies cardiovasculaires. La dysfonction endothéliale associée à l'hypertension est souvent caractérisée par un déséquilibre entre la production et l'élimination de ROS, favorisant ainsi un état pro-oxydant de la cellule. Mise à part l'impact sur la biodisponibilité du NO, les ROS ont également la capacité de moduler les dynamiques calciques. CaMKII étant également un senseur du stress oxydant pourrait être



impliquée dans la dysfonction endothéliale. Toutefois, son rôle dans l'endothélium vasculaire n'est pas encore établi. Nous avons donc effectué des études permettant d'établir une relation entre les dynamiques calciques endothéliales, plus précisément les pulsars calciques, et CaMKII dans deux modèles murins d'hypertension.

## **6.1 Hypothèses de la thèse**

Les pulsars calciques sont une signalisation calcique oscillatoire pouvant être impliquée dans la modulation du tonus vasculaire et CaMKII est impliquée dans la fonction vasculaire par sa capacité à décoder ce type de signal calcique. L'hypothèse principale de cette thèse est que CaMKII endothéliale est un effecteur des pulsars calciques. Toutefois, cette thèse est fondée sur toutes les hypothèses suivantes :

- Les dynamiques calciques endothéliales, plus particulièrement les pulsars calciques localisés dans les PMEs, varient selon le type de vaisseaux sanguins.
- Les pulsars calciques modulent l'activation et la distribution intracellulaire de CaMKII dans les CEs d'artères mésentériques natives de souris.
- Les ROS modulent les pulsars calciques et par conséquent l'activation et la distribution intracellulaire de CaMKII dans les CEs d'artères mésentériques natives de souris.
- La relation entre les pulsars calciques et CaMKII est altérée en condition pathologique telle que l'hypertension artérielle, impliquant une dyshoméostasie calcique et un état pro-oxydant.

## **6.2 Objectifs de la thèse**

L'objectif principal de cette thèse a été d'établir une corrélation entre les pulsars calciques et l'activation/distribution de CaMKII afin d'en définir un rôle physiopathologique dans la fonction ou la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension. Plusieurs objectifs secondaires ont été définis :

- Déterminer les différences dans la fréquence et les cinétiques des dynamiques calciques endothéliales dans les artères mésentériques, pulmonaires et coronariennes de souris.

- Déterminer l'impact des pulsars calciques sur l'activation de CaMKII dans l'endothélium d'artères mésentériques natives de souris.
- Déterminer l'impact des ROS sur les pulsars calciques et les conséquences sur l'activation de CaMKII.
- Déterminer l'impact de l'hypertension sur les pulsars calciques et les conséquences sur l'activation de CaMKII
- Déterminer l'implication de l'activation de CaMKII dans la fonction endothéliale.

### 6.3 Publications

Les travaux de recherche effectués pour cette thèse ont mené à la rédaction de trois articles de recherche originaux soumis, à titre de première auteure, dans des revues scientifiques:

1. **Charbel C.**, Toussaint F., Béziau D., Gillis M-A., Blanchette A., Mamarbachi M., Boussette N., Comtois P., Ledoux J., Functional activation of endothelial CaMKII by  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains. *Science advances*, Juin 2015, Accepté avec des corrections mineures.
2. **Charbel C.**, Toussaint F., Gillis M-A., Blanchette A., Ledoux J., New insights on endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains and CaMKII in Angiotensin II-induced hypertension. En préparation.
3. **Charbel C.**, Dayeh N. R., Taylor M.S., Dupuis J., Comtois P., Ledoux J., Localized endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  signaling is strongly conserved amongst vascular beds. En préparation.

Cette thèse a également mené à la publication d'un article de revue à titre de premier auteure publié et deux articles de recherche originaux à titre de coauteure:

4. **Charbel C.**, Toussaint F., Ledoux J., Les dynamiques calciques : Côté lumineux de la signalisation endothéliale. (Revue de la littérature) *Médecine Sciences Amériques*, CRCQ-2012 :Vol.2; No.2.
5. Toussaint F., **Charbel C.**, Blanchette A., Ledoux J., CaMKII regulates intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in native endothelial cells. *Cell Calcium*, 2015. 58(3): p. 275-85.

6. Béziau D.M., Toussaint F., Blanchette A., Dayeh N.R., **Charbel C.**, Tardif JC., Dupuis J., Ledoux J., Expression of phosphoinositide-specific phospholipase C isoforms in native endothelial cells. PLoS One., 2015 Apr 13;10(4) :e0123769.

Il est toutefois important de noter que la soutenance de thèse ne portera que sur les trois articles soumis à titre de première auteure.

## **RÉSULTATS**

*“The most beautiful experience we can have is the mysterious - the fundamental emotion which stands at the cradle of true art and true science.”*

*« La plus belle expérience que nous pouvons avoir est le mystérieux - l'émotion fondamentale qui se trouve au berceau de l'art véritable et la vraie science. »*

*— Albert Einstein*

## Article 1

**Charbel C.**, Toussaint F., Béziau D., Gillis M-A., Blanchette A., Mamarbachi M., Bousette N., Comtois P., Ledoux J., Functional activation of endothelial CaMKII by  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains. *Science Advances*, Juin 2015, Accepté avec des corrections mineures.

### Apport original et contribution des coauteurs

Titre : Functional activation of endothelial CaMKII by  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains.

Auteurs : Chimène Charbel, Delphine Béziau, Fanny Toussaint, Marc-Antoine Gillis, Alexandre Blanchette, Maya Mamarbachi, Nicolas Bousette, Philippe Comtois et Jonathan Ledoux.

Ce manuscrit a été accepté en juin 2015 avec des corrections mineures pour une publication dans la revue scientifique *Science Advances*.

Contribution des auteurs :

**Chimène Charbel** : Auteure principale du manuscrit ayant élaboré les hypothèses et objectifs du projet, ainsi que la conception et le design expérimental, effectué les expériences, la cueillette et l'analyse des données (à l'exception de la création des shRNA), l'interprétation des résultats et la préparation complète du manuscrit.

**Delphine Béziau** : Coauteure ayant participé à la conception et au design expérimental pour la création des shRNA, la cueillette des données et l'approbation de la version finale du manuscrit.

**Fanny Toussaint** : Coauteure ayant effectué des expériences, participé à la cueillette des données d'immunofluorescence et de Western blot et approuvé la version finale du manuscrit.

**Marc-Antoine Gillis** : Coauteur ayant participé à la cueillette et à l'analyse des données hémodynamiques des souris hypertendues, ainsi que l'approbation de la version finale du manuscrit.

**Alexandre Blanchette** : Coauteur ayant effectué des expériences, participé à la cueillette des données d'immunofluorescence et de Western blot et approuvé la version finale du manuscrit.

**Maya Mamarbachi** : Coauteure ayant participé à la conception et au design expérimental pour la création des shRNA, à la cueillette des données et à l'approbation de la version finale du manuscrit

**Nicolas Boussette** : Coauteur ayant participé à la conception et au design expérimental pour la création des shRNA et à l'approbation de la version finale du manuscrit.

**Philippe Comtois** : Coauteur ayant créé et élaboré le design expérimental d'un algorithme dans Matlab (ATIFIsNI), nécessaire à la quantification des données d'immunofluorescence et ayant participé à l'approbation de la version finale du manuscrit.

**Jonathan Ledoux** : Directeur de thèse et investigateur principal ayant supervisé l'ensemble du projet et élaboré le design expérimental, l'analyse des données, l'interprétation des résultats et participé à la révision, correction et approbation de la version finale du manuscrit.

## Mise en contexte de l'article 1

Les pulsars calciques sont une libération spontanée et oscillatoire de  $\text{Ca}^{2+}$ , localisés au niveau des PME. Des évidences ont montré que les pulsars pourraient être impliqués dans le contrôle du tonus vasculaire en modulant l'hyperpolarisant la membrane des CMLVs *via* l'activation des canaux potassiques  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  endothéliaux. L'importance et l'avantage de ce type de signal localisé est la spécificité et l'économie d'énergie pour la cellule à engendrer une réponse cellulaire. Les dynamiques calciques locales ont la capacité de générer une réponse physiologique aussi importante que la signalisation globale sans impliquer tous les mécanismes cellulaires sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$ . Toutefois, les voies de signalisations activées par les pulsars calciques demeurent peu caractérisées.

CaMKII a la capacité de décoder les oscillations calciques en des réponses cellulaires spécifiques, ce qui fait de cette protéine une cible potentielle idéale des pulsars calciques. La configuration multimérique de CaMKII ainsi que sa capacité à s'autophosphoryler confère à l'enzyme la propriété d'intégrer les signaux calciques oscillatoires. Jusqu'à présent, très peu d'études semblent caractériser CaMKII au niveau des CE d'artères natives. Toutefois, des études suggèrent qu'en condition physiologique CaMKII est impliquée dans la fonction endothéliale en modulant l'activation de la NOS3 et par conséquent, la production de NO. D'autre part, dans un modèle animal diabétique, certains suggèrent que la phosphorylation de NOS3 par CaMKII est plutôt délétère à la fonction endothéliale. Sachant qu'une dysfonction endothéliale associée au diabète est caractérisée par un découplage de la NOS3, son activation par CaMKII pourrait participer au découplage de l'enzyme en favorisant la production de ROS au détriment du NO. Ces évidences suggèrent que CaMKII pourrait jouer un rôle important dans la fonction et la dysfonction endothéliale. De nombreuses évidences ont montré une altération de l'homéostasie calcique et des protéines impliquées dans les mécanismes régulateurs en hypertension. Néanmoins, la relation entre CaMKII et la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension n'a pas encore été établie.



## Hypothèses et objectifs de l'article 1

L'hypothèse principale de cette étude est que les pulsars calciques, localisés dans les PMEs, activent spécifiquement CaMKII au niveau de l'endothélium d'artères natives de souris et que cette relation est altérée en hypertension artérielle.

Ainsi, l'objectif principal est d'établir une corrélation entre les pulsars calciques et l'activation/distribution de CaMKII dans l'endothélium d'artères mésentériques afin d'en définir un rôle physiopathologique dans la fonction ou la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension.

**Les objectifs spécifiques sont :**

1. Identifier l'expression génique des différentes isoformes de CaMKII.
2. Déterminer la localisation intracellulaire des isoformes de CaMKII.
3. Établir l'impact d'une stimulation des pulsars calciques sur l'activation et la localisation de CaMKII.
4. Évaluer l'implication de CaMKII dans la production de NO suite à une stimulation des pulsars calciques.
5. Établir un modèle d'hypertension artérielle chez la souris.
6. Identifier l'impact de l'hypertension artérielle sur les pulsars calciques et l'activation/distribution de CaMKII endothéliale.
7. Créer un *knock-down* pour les isoformes de CaMKII endothéliale à l'aide de shRNA, afin de valider l'impact de CaMKII dans la production de NO.

## Manuscript

### FUNCTIONAL ACTIVATION OF ENDOTHELIAL CAMKII BY $\text{Ca}^{2+}$ MICRODOMAINS

Chimène Charbel<sup>1,2</sup>, Fanny Toussaint<sup>1,3</sup>, Delphine Béziau<sup>1</sup>, Marc-Antoine Gillis<sup>1</sup>,  
Alexandre Blanchette<sup>1</sup>, Maya Mamarbachi<sup>1</sup>, Nicolas Bousette<sup>1,5</sup>, Philippe Comtois<sup>1,3,6</sup>,  
Jonathan Ledoux\*<sup>1-4</sup>

\*Corresponding author

**One-sentence summary:** Endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains are essential regulators of Nitric  
Oxide Synthase (NOS3) and CaMKII.

---

<sup>1</sup>Research Center, Montreal Heart Institute, Quebec, Canada. <sup>2</sup>Departments of Pharmacology,  
<sup>3</sup>Molecular and Integrative Physiology, <sup>4</sup>Medicine, <sup>5</sup>Surgery and <sup>6</sup>Institute of biomedical  
engineering, Université de Montréal, Quebec, Canada.

## ABSTRACT

Localized  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations like  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars appear important to endothelial function although the intracellular pathways involved are yet to be determined. Interestingly,  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin Kinase II (CaMKII), an important multifunctional kinase, interprets intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signals like  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars into specific outcomes. The elucidation of a functional relationship between endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains, namely  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars, and CaMKII was then endeavored. Unexpected expression of CaMKII $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\delta$  is found in endothelium of mesenteric arteries. From a homogeneous distribution in resting conditions,  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars promote an isoform-specific translocation of CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  within myoendothelial projections (MEPs).  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar-induced activation of CaMKII amplifies nitric oxide production as evidenced by adeno-associated viral knockdown of both CaMKII $\alpha$  and  $\beta$ . CaMKII $\alpha$  &  $\beta$  translocation within MEPs correlates with  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar frequency and both are increased in arterial hypertension. This study shows a novel endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains - CaMKII pathway, strengthening our understanding of  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains in endothelial pathophysiology.

## INTRODUCTION

Expressed as four different isoforms ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  and  $\gamma$ ) (1),  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII) is a multifunctional regulatory protein involved in the modulation of several biological functions, such as gene transcription (2), membrane excitability (3) and  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis (4, 5). Recent evidence suggests a role of CaMKII in the development of cardiovascular diseases such as heart failure (6) and diabetes-associated vasculopathies (7, 8). Indeed, CaMKII regulates cardiomyocyte  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis through phosphorylation of  $\text{IP}_3\text{Rs}$  (4) and phospholamban (5). An increasing body of evidence suggests a significant role of the serine/threonine kinase in the regulation of vascular functions (9, 10) and explains the growing interest towards vascular CaMKII.

The multimeric kinase has the distinctive ability to decode and integrate oscillatory  $\text{Ca}^{2+}$  signaling through subsequent autophosphorylation processes (11). Indeed, autophosphorylation of CaMKII subunits relieves their dependency on the  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin complex to be activated. Activation levels of CaMKII are modulated by the frequency and amplitude of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations, which correspondingly modulate its downstream signaling (11, 12).

Recent studies showed that endothelial CaMKII modulates NOS3 expression and activation (13-16). Although NOS3 activation requires an elevation in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, nitric oxide (NO) production can also be regulated through serine phosphorylation at Ser1177 (17). In cultured endothelial cells, CaMKII phosphorylates NOS3, stimulating NO production in response to a rise in global intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  (14, 15). Moreover, aortic endothelial cells (ECs) from type 2 diabetic rats show decreased NO production attributable to a CaMKII-associated impairment of endothelial function (18). However, the mechanism of endothelial CaMKII activation remains elusive.

Interestingly,  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars, which are spontaneous oscillatory  $\text{Ca}^{2+}$  signals, have been characterized in endothelium from murine mesenteric arteries (19). According to its spatial distribution within myoendothelial projections (MEPs), this signal is uniquely positioned to significantly regulate vascular tone.  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar frequency and kinetics suggest that it can activate CaMKII. These  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars might then represent a novel and distinctive activation mechanism for endothelial CaMKII, which together, may play an important role in endothelial

function. However, our understanding of endothelial CaMKII and  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars signaling is limited. Moreover, pathophysiological conditions might alter the pulsar-CaMKII relationship. Indeed, altered endothelial intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis is a hallmark of cardiovascular diseases such as hypertension (20). Hence, compromised  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis as it occurs in hypertension may also affect CaMKII regulation and therefore its downstream signaling.

We hypothesized that  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars modulate CaMKII activation and distribution within endothelial cells from native mesenteric arteries and this relation is altered in arterial hypertension. Furthermore, this study demonstrates the specific isoforms expressed in native vascular endothelium, and unravel a novel relationship between endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains and CaMKII in pathophysiological conditions.

## RESULTS

**CaMKII isoforms expression and distribution in resistance arteries.** We first sought to determine the expression of the four mammalian CaMKII isoforms ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ) in mesenteric arteries (MA). Real-time PCR showed the presence of mRNA encoding for all CaMKII isoforms in whole MA from mice (Fig. 1A). Originally thought to be restricted to the brain, mRNA encoding for CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  was found in MA and freshly isolated ECs, as was the  $\delta$  isoform. Moreover, the exclusive expression of splice variant 1 of CaMKII $\beta$  in whole MA and ECs was also confirmed. However, CaMKII $\gamma$  mRNA was only detected in whole MA, suggesting that this isoform is not expressed in ECs (Fig. 1A). Migration of PCR products on agarose gel and amplicons sequencing confirmed isoforms identity. In agreement with the qPCR results, western blots (Fig. 1A) revealed the expression of CaMKII $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\delta$  proteins in MA with a faint signal for CaMKII $\gamma$ .

The expression of CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  in resistance arteries described above is strengthened by immunofluorescence experiments on cut-open MA. Interestingly, expression of both CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  isoforms appears to be restricted to ECs, with no fluorescence detected in the associated smooth muscle (Fig. 1Ba & Bb). Distribution of both CaMKII isoforms appears homogeneous besides a few clusters (arrows) located at fenestrations in the IEL, corresponding to potential MEPs. Cross-sectional views of mesenteric arteries display CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  projecting within IEL fenestrations. In contrast, CaMKII $\delta$ -associated immunostaining was found in both cell types with a homogeneous distribution in vascular smooth muscle cells (VSMCs) and a strong signal at the plasma membrane and a Golgi apparatus structure in ECs (Fig. 1Bc and Fig. S1). CaMKII $\gamma$  appears to be present in VSMCs but was not detected in ECs (Fig. 1d), consistent with the qPCR data from isolated ECs.

**Ca<sup>2+</sup> microdomains activate endothelial CaMKII.** Investigation of the impact of Ca<sup>2+</sup> pulsars on CaMKII activation and intracellular distribution requires an approach that specifically stimulates Ca<sup>2+</sup> pulsars with little if any effect on global Ca<sup>2+</sup> levels in ECs. Taking advantage of the myocyte-specific expression of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors, phenylephrine (PE; 10  $\mu$ M) stimulates Ca<sup>2+</sup> pulsars without affecting endothelial global Ca<sup>2+</sup> levels or other Ca<sup>2+</sup> signals (Fig. S2). Indeed, acute exposure of MA to PE had no effect on Ca<sup>2+</sup> waves frequency and propagation speed or on global Ca<sup>2+</sup> levels in ECs (Fig. S2B & C).

However, PE significantly increased  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars frequency ( $256 \pm 34\%$  of control) (Fig. S2A). Pre-incubation with Carb ( $10 \mu\text{M}$ ), a gap junction inhibitor abolished PE-induced stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars ( $90 \pm 30\%$ ), showing the VSMC-specific stimulation. Noteworthy, myocytes do not basally influence endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars, as Carb exposure alone had no effects on  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars ( $87 \pm 25\%$ ).

CaMKII can be translocated in response to activation (21). Thus, we first sought to determine modulation of CaMKII isoform localization by PE-induced  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars (Fig. 2).  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar stimulation is associated with increased CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  cluster formation located at IEL fenestrations (Fig. 2A, B & D). Increased CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  clustering by  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars is supported by cross-sectional view of 3D image stacks (2A-e & 2B-e). Incubation of the arteries with KN-93 ( $10 \mu\text{M}$ ; 15 min), a CaMKII inhibitor, prior to PE exposure, inhibited endothelial CaMKII clustering. Indeed, in the presence of KN-93, CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  appears to be homogeneously distributed (Fig. 2A, B & D). However, exposure to PE had no effect on CaMKII $\delta$  intracellular distribution in ECs, in the absence or presence of KN-93 (Fig. 2C). CaMKII fluorescence analyses clearly show an increase in CaMKII $\alpha$  ( $5.3 \pm 0.6 \text{ intensity}/\mu\text{m}^2$  vs.  $8.6 \pm 0.8 \text{ intensity}/\mu\text{m}^2$ ) and  $\beta$  ( $5.1 \pm 0.8 \text{ intensity}/\mu\text{m}^2$  vs.  $8.3 \pm 0.7 \text{ intensity}/\mu\text{m}^2$ ) densities within IEL fenestrations after PE stimulation, an effect abolished by the presence of KN-93 (Fig. 2D-a, b). In contrast, CaMKII $\delta$  fluorescence was not affected within IEL fenestrations ( $3.8 \pm 0.7 \text{ intensity}/\mu\text{m}^2$  vs.  $3.8 \pm 0.4 \text{ intensity}/\mu\text{m}^2$ ) (Fig. 2D-c). Activated CaMKII (T286) was also found in clusters within IEL fenestrations and distributed throughout the cell in resting conditions (Fig. 3A). Interestingly, an increased proportion of phosphorylated CaMKII clusters in IEL fenestrations was observed in endothelium exposed to PE (Fig. 3B), an effect abolished by pre-incubation with KN-93. Actually, immunostaining of T286 was barely detectable in the presence of KN-93 (Fig. 3C), suggesting that KN-93 efficiently inhibited CaMKII activation. Nevertheless, T286 fluorescence analysis demonstrated a 70% increase in T286 density within IEL fenestrations in PE ( $10 \pm 1 \text{ intensity}/\mu\text{m}^2$  vs.  $17 \pm 1 \text{ intensity}/\mu\text{m}^2$ ) and 20 % increase of marked IEL fenestrations ( $75 \pm 4\%$  vs.  $90 \pm 1\%$ ), while KN-93 blunted this increase ( $3.9 \pm 0.8 \text{ intensity}/\mu\text{m}^2$  and  $58 \pm 5\%$ , respectively) (Fig. 3D).

**$\text{Ca}^{2+}$  pulsars stimulate NO production through CaMKII activation.** Phosphorylation of NOS3 by CaMKII has been shown to stimulate the production of NO (14, 15, 22). Since,

CaMKII can be activated by  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars, as shown above, the impact of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars on endothelial NO production was investigated. Exposure of endothelium loaded with DAF-FM (20  $\mu\text{M}$ ), a NO fluorescent dye, to PE significantly increased endothelial NO production by 39% ( $1.003 \pm 0.001$  vs.  $1.39 \pm 0.03$ ), suggesting that  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars stimulate NOS3 (Fig. 4A, C & D). Evidence for the contribution of CaMKII to the  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar-induced production of NO is presented in Fig. 4B-D. Hence, pre-incubation of the arteries with KN-93 decreased PE-induced NO production by 46 % ( $1.21 \pm 0.03$  vs.  $1.39 \pm 0.03$ ) (Fig. 4D). This PE stimulation of DAF-FM fluorescence was specific as L-NAME (10  $\mu\text{M}$ ), a NOS inhibitor, or Carb (10  $\mu\text{M}$ ) abolished the increase in fluorescence. Sustainability of the preparation and dye loading was tested with the application of SNP (10  $\mu\text{M}$ ), a NO donor, at the end of experiments, which raised the fluorescent signal in all conditions (Fig. 4D & E). Furthermore, despite consistently detected throughout the endothelial cells in all experimental conditions, inhibition of CaMKII significantly decreased NOS3 phosphorylation (pNOS3) within MEPs (Fig. S3).

Injection of a mixed population of adenovirus (AAV-1) containing shRNA-targeting CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  in mice resulted in a significant decrease in both CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  protein levels ( $\approx$ -50% and -30% vs. scramble, respectively) in MA (Fig. S4A). The impact of adenoviral-associated silencing of CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  on NO production was then sought. Consistent with the pharmacological inhibition of CaMKII, adenoviral silencing of CaMKII induced a 0.5-Fold change in PE-induced NO production (-56% vs. scramble group) (Fig. S4B).

**Endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains and MEPs are altered in hypertension.** An alteration of endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis has been reported in hypertension and the correlated endothelial dysfunction (20). Accordingly, an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars frequency was observed in endothelium from hypertensive GCaMP2-expressing mice ( $2.05 \pm 0.05$  Hz) compared to normotensive (NT) mice ( $1.34 \pm 0.1$  Hz) with no differences in  $\text{Ca}^{2+}$  waves frequency (Fig. S5). Moreover, alteration of the IEL and endoplasmic reticulum (ER) morphology in hypertension was revealed by immunostaining of calnexin as an ER marker (Fig. S6A). Indeed, ratio of calnexin-labeled IEL fenestrations (refers to the number of occupied IEL fenestrations) is increased in hypertensive (AH) mice ( $66 \pm 3\%$  vs.  $78 \pm 2\%$ ). The size of



MEPs also increased in AH ( $2.7 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$  vs.  $4.4 \pm 0.5 \mu\text{m}^2$ ) as the surface of labeled IEL fenestrations in AH mice is greater than in NT ( $4.4 \pm 0.5 \mu\text{m}^2$  vs.  $2.7 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$ ) (Fig. S6B).

**CaMKII $\beta$  expression is decreased in hypertension.** As a modulator of endothelial function, CaMKII may be regulated in hypertension. The relationship between CaMKII and hypertension was then investigated in MA from PE-infused mice. No changes in the relative expression of CaMKII $\alpha$ ,  $\delta$  and  $\gamma$  were found in MA from AH animals (Fig. S7A, C & D). However, 49% decrease in CaMKII $\beta$  mRNA was observed in AH mesenteric arteries ( $0.5 \pm 0.1$ ) compared to normotensive animals (NT,  $0.98 \pm 0.05$ ) (Fig. S7B). Furthermore, the expression of CaMKII $\beta$  appears to correlate with the arterial blood pressure as a linear regression can be established ( $r^2 = 0.7293$ ,  $P < 0.002$ ) (Fig. S7E).

**Endothelial CaMKII activation in hypertension.** Subcellular targeting of CaMKII also appears to be modified in endothelial dysfunction. CaMKII $\alpha$  ( $5.5 \pm 0.3$  intensity/ $\mu\text{m}^2$  vs.  $8.3 \pm 0.9$  intensity/ $\mu\text{m}^2$ ) and  $\beta$  ( $5.6 \pm 0.4$  intensity/ $\mu\text{m}^2$  vs.  $12.0 \pm 0.9$  intensity/ $\mu\text{m}^2$ ) are higher in density in ECs from AH mice (Fig. 5Aa, b & d). CaMKII $\delta$  distribution was not significantly different in either group ( $3.9 \pm 0.9$  intensity/ $\mu\text{m}^2$  vs.  $3.8 \pm 0.6$  intensity/ $\mu\text{m}^2$ ), with a preferential distribution at the plasma membrane and to the Golgi apparatus structure in both groups (Fig. 5C and Fig. S1). Immunostaining for CaMKII T286 showed a predominant cluster distribution of the activated enzyme in AH endothelium ( $8 \pm 1$  intensity/ $\mu\text{m}^2$  vs.  $16 \pm 2$  intensity/ $\mu\text{m}^2$ ) (Fig. 5a & b). Moreover, CaMKII T286 clustering within MEPs was significantly increased by 32% in AH mice ( $65 \pm 3\%$  vs.  $86 \pm 3\%$ ). Similar distribution of T286 and CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  suggest that both isoforms are the activated endothelial CaMKII in AH.

## DISCUSSION

This study provides the first direct evidence that spatially-restricted IP<sub>3</sub>R-driven Ca<sup>2+</sup> signaling functionally activates Ca<sup>2+</sup>-dependent enzymes in vascular cells. CaMKII, through its capacity to integrate intracellular Ca<sup>2+</sup> frequency, may play a prime role as an effector of localized Ca<sup>2+</sup> signals such as Ca<sup>2+</sup> pulsars, an unsuspected role in non-excitable cells. Moreover, Ca<sup>2+</sup> microdomains-CaMKII signaling pathway is altered in endothelial dysfunction and the corollary hypertension.

The use of PE, a  $\alpha_1$ -adrenergic agonist, allowed the investigation of the specific outcome of MEP-localized Ca<sup>2+</sup> signals stimulation (23, 24). Indeed, only Ca<sup>2+</sup> pulsar appears to be stimulated by PE, with little if any changes in global Ca<sup>2+</sup> levels and Ca<sup>2+</sup> waves. Ca<sup>2+</sup> pulsar-specific stimulation is probably attributable to a slight increase in VSMCs-derived IP<sub>3</sub> or Ca<sup>2+</sup> within MEPs, as suggested by Isakson (2007). Since ECs do not express  $\alpha_1$ -adrenergic receptors, PE only activates VSMCs GPCR-coupled adrenoreceptors leading to an increase in IP<sub>3</sub> and Ca<sup>2+</sup> (24, 25) then thought to be transmitted to the MEP. The VSMCs requirement is evidenced by the abolition of PE-induced stimulation of Ca<sup>2+</sup> pulsars in the presence of carbenoxolone, a gap junction inhibitor. Although effects unrelated to gap junction inhibition have been reported for carbenoxolone, none are related to the observed effect in this study. Moreover, carbenoxolone has no effect on basal Ca<sup>2+</sup> pulsars and our data is consistent with a block of EC-VSMC communication by the drug. Interestingly, PE only increased Ca<sup>2+</sup> pulsars frequency with slight modifications of kinetic parameters (Table S1). More importantly, this approach builds on the concept of bidirectional communication between the two cell types. Indeed, endothelial modulation of myocyte function through gap junctions has been reported on numerous occasions (23, 26). Smooth muscle communication to the endothelium has been shown and recent evidence suggested that a specific endothelial signal can be activated by vascular myocytes (23, 24). Here we show that a contractile-triggering increase in smooth muscle Ca<sup>2+</sup> or IP<sub>3</sub> leads to the activation of a vasorelaxing-driven endothelial signaling pathway. Moreover, PE-induced activation of Ca<sup>2+</sup> pulsars leads to an increase in NO production, initial evidence that an endothelial localized Ca<sup>2+</sup> signal triggers the generation and release of NO.

Data presented in this study was diligently interpreted, especially considering the nature of the approaches used and their respective limitations. However, several lines of evidences from others' work are in line with our conclusions. Indeed, despite direct recording of transmyoendothelial migration of IP<sub>3</sub> have been reported yet, work from several groups (23-26) in addition to the results presented herein are consistent with this notion. Similarly, subcellular localization of proteins within MEP is suggested by confocal imaging but confirmation of this specific localization would require electron microscopy. Interestingly, Sandow's group exhaustively studied and characterized MEPs using electron microscopy and our data is consistent with the published work.

Our group and others have shown that localized endothelial Ca<sup>2+</sup> pulsars can lead to activation of K<sub>Ca</sub>3.1 channels within the MEPs (19, 27). However, other targets for Ca<sup>2+</sup> pulsars have not been identified yet. NO, the most important endothelium-derived vasodilator represents a natural partner for Ca<sup>2+</sup> pulsars in the control of vascular diameter. Indeed, localization of NOS3 within MEPs has been reported (28) and Ca<sup>2+</sup> microdomains leading to activation of the Ca<sup>2+</sup>-dependent enzyme could then benefit from this preferential distribution. NO produced within MEP would most efficiently get to the underlying smooth muscle to activate soluble guanylate cyclase. Acomputational simulation suggest that oscillatory Ca<sup>2+</sup> signals and corresponding NO production would be more efficient in modulating VSMC contractile status than constant NO production (29). Within this concept lies the crux of intracellular microdomains: lower energy levels are required for an outcome of similar magnitude. The current work does not exclude potential hyperpolarizing propagation of the EC membrane outside MEPs that would lead to Ca<sup>2+</sup> increase rate and NOS3 activation outside MEPs. However, such hypothesis would require a very small increase in Ca<sup>2+</sup> that was not detected during our Ca<sup>2+</sup> imaging. Unfortunately, basal NO production by spontaneous Ca<sup>2+</sup> pulsars (i.e. in the absence of stimulation) could not be determined.

A significant fraction of the Ca<sup>2+</sup> pulsar-induced increase in NO production is sensitive to both KN-93, a CaMKII inhibitor, and to adeno-associated virus mediated suppression of CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  expression. Moreover, our analysis of deconvolved confocal images is consistent with an inhibition of CaMKII decreasing phosphorylated NOS3 within MEPs with little effect on bulk cytoplasmic pNOS3. Accordingly, recent evidence suggests that CaMKII could stimulate NO production through phosphorylation of NOS3, which would increase the

$\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of the enzyme and thus lead to an augmented production of NO in cultured endothelial cells (14, 15). Importantly, our data strongly suggest that CaMKII has been underestimated in its role as a modulator of NO production as it is associated with a two-fold increase in NO production by  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars.

$\text{Ca}^{2+}$ -pulsars mediated stimulation of NOS3 must be localized within MEPs. Therefore, CaMKII must also be localized within the MEP to increase NO production. Interestingly, from the four mammalian CaMKII isoforms, only CaMKII $\gamma$  was not detectable in freshly isolated endothelial cells while its expression was found in vascular myocytes, along with CaMKII $\delta$ . Both CaMKII $\delta$  and  $\gamma$  has been previously well characterized in VSMCs. In the endothelium, CaMKII $\delta$  appears to be targeted to the Golgi and to the plasma membrane, suggesting a potential role in regulation of membrane associated proteins such as ion channels, as shown in VSMCs (3). Expression of both CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  in endothelial cells was unexpected. Indeed, the current literature generally assumes that CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  expression is restricted to the brain whilst  $\delta$  and  $\gamma$  isozymes are broadly expressed. Thus, CaMKII isoform expression in native endothelium has not been addressed before and little interest has been drawn on  $\alpha$  and  $\beta$  in endothelial cells. However, CaMKII $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\delta$  are indeed expressed in native murine endothelium. Accordingly, the restricted expression of CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  to the endothelium is an appealing perspective of cardiovascular cell-type specific role for the different CaMKII isoforms. Moreover, the identification of the specific variant, CaMKII $\beta$  in murine endothelium is intriguing but little is known on the characteristics of this variant (12). Further investigation is required to elucidate the specific role of this variant in endothelial cells.

Intracellular distribution of CaMKII isozymes in endothelium from intact arteries has never been investigated before, essentially due to the lack of identified intracellular architecture with the capacity or the characteristics of either triggering activation and translocation of CaMKII. The MEP, an important structure of bidirectional communication between the endothelium and the underlying smooth muscle allows for tight regulation of vascular tone and other vascular functions. These MEPs enclose several proteins involved in endothelial functions, which represent potential targets for CaMKII, including NOS3 (28). Moreover, the  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar is an oscillatory  $\text{Ca}^{2+}$  signal within the MEP that could lead to the activation of CaMKII, as  $\text{Ca}^{2+}$ -frequency dependent kinase. In resting conditions – which in this study is defined as the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars stimulation – CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  are generally

homogeneously distributed with little clusters localized in regions consistent with MEPs. Upon  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars stimulation, clustering of both CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  can be observed and localization of these clusters is consistent with MEP. An increase in the activated form (T286) of CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  –but not  $\delta$ – density within MEP-associated structures was found following stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars and illustrate the translocation of the enzyme to regions consistent with MEPs.

Combined translocation of both CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  following  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar stimulation is in agreement with previous work in neurons (30). Indeed, CaMKII $\beta$  binds F-actin and is then responsible for the heteromultimer localization at the dendritic spines (21, 31). Accordingly, CaMKII $\beta$  could be involved in the translocation of a  $\alpha/\beta$  heteromultimeric CaMKII to the MEP in response to  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar stimulation. CaMKII activation is required for the enzyme translocation since inhibition of the kinase blocks clustering of the enzyme within these regions. This relationship may rely on the frequency of the oscillatory signal as both isoforms have different sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  signal frequency.

Previous work in cultured cells suggested that CaMKII could phosphorylate and stimulate NOS3 (14, 15) in response to shear stress (32). Accordingly, our results show that inhibition of CaMKII significantly dampens both the  $\text{Ca}^{2+}$ -pulsar-induced increase in NO production and NOS3 phosphorylation within MEPs. In addition to stimulation of NO production, endothelial CaMKII might be involved in other cellular functions within MEPs. Indeed, CaMKII regulates connexin conductance through phosphorylation of Cx37 found at the MEP and thus could modulate VSMC-EC coupling (33, 34). Also, CaMKII is involved in the regulation of cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, notably through phosphorylation of IP<sub>3</sub>R (4) and phospholamban (5). A similar role is suspected in endothelium (35) where CaMKII would be involved in a feedback loop, regulating  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars(36). Therefore, elucidation of CaMKII translocation to MEP upon  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars stimulation unveils a multiplicity of CaMKII targets involved in endothelial function through  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains.

Reactive oxygen species (ROS) might stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars (37) and CaMKII (38). The PE-infusion model was thus used to study the impact of an increased blood pressure on  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars and CaMKII, independently of oxidative stress. This animal model is commonly used as comparative model (hypertension without high levels of ROS) when investigating the ROS-contribution in AngII-induced hypertension (39). The impact of pathological conditions

on  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars has not yet been reported. Due to their specific localization within MEPs, the impact of hypertension on  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars may result from increases in MEPs number as reported in SHR rats (40). Accordingly, despite a similar fenestration of the IEL, a larger number of MEPs (suggested by calnexin staining) was noted in hypertension. Furthermore, IEL fenestrations and MEPs appear larger in hypertensive animals and correlates with an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar frequency. This increase in  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar firing rate might be a mechanism in response to the increase in intraluminal pressure and/or shear stress with the ultimate goal of recovering normal blood pressure.

The increase in  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars in hypertension is associated with an increased translocation of CaMKII to MEPs. Indeed, clusters of activated CaMKII and both CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  are large and localized at the IEL fenestrations of hypertensive animals in the absence of further stimulation. Noteworthy, immunolabelling of activated CaMKII shows clusters almost exclusively in subcellular regions consistent with MEPs, suggesting that most of the activated CaMKII translocate to the MEP in hypertension. Again, endothelial distribution of CaMKII $\delta$  is not different in hypertensive animals. Interestingly, no changes in nuclear CaMKII could be detected highlighting the outcome-specific nature of the CaMKII activation stimulus. For example, activation of a G protein-coupled receptor might trigger a different  $\text{Ca}^{2+}$  signal that would lead to the translocation of the enzyme to the nucleus and activation of transcription factors (2). Similarly, different conditions might result in a translocation of CaMKII $\delta$ , but no changes have been noticed in hypertension. Unlike other CaMKII isoforms, CaMKII $\beta$  expression seems to be inversely correlated to the blood pressure as less mRNA encoding for the isoform is detected in arteries from animals with higher blood pressure. However, the actual consequences of such blood pressure-CaMKII $\beta$  expression relationships remain to be determined.

$\text{Ca}^{2+}$  dyshomeostasis is an important factor of cardiovascular diseases and endothelial dysfunction and this study establishes the alteration of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars, a localized  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, in hypertension. In response to  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars, endothelial-specific isoforms of CaMKII appears to translocate to MEPs, which are structurally altered in this pathology. Correlation of NOS3 activation by CaMKII with localized  $\text{Ca}^{2+}$  signaling revealed herein establishes  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars – CaMKII – NOS3 as a critical regulatory pathway for endothelial function. These findings

strengthen our understanding of the complex relationship between endothelial dysfunction,  $\text{Ca}^{2+}$  microdomain alterations and hypertension.

## METHODS

**Tissue preparation.** All animal manipulations were approved by the Montreal Heart Institute Research Center Animal Deontology Committee. Mesenteric arteries (MA, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> order) were harvested from male C57BL/6, shRNA- CaMKII $\alpha$ / $\beta$  or GCaMP2 (41) mice. Freshly harvested mesenteric arteries (diameters  $\approx$  60-100  $\mu$ m) from mice (3-4 months old) were carefully cleaned of connective and adipose tissue prior to experimentation. All dissections were carried out in cooled HEPES solution. Arterial hypertension (AH) mouse model was induced by subcutaneous implantation of a mini-osmotic pump (Alzet) for chronic release (7 days) of phenylephrine (PE, 40 mg/Kg/day)(39) according to manufacturer indications. Pumps containing only vehicle (saline 0.9% NaCl) were implanted for the control group (normotensive; NT). Anesthetized mouse (2% isoflurane) blood pressure and hemodynamic parameters were acquired at 7 days post-surgery from the right carotid and from the left ventricle (Fig. S8). Blood pressure and hemodynamics parameters were acquired using a Millar catheter 1.4F spr839 (Millar instrument). Values were collected and analyzed using the IOX v2.8.1.8 software (EMKA technologies). Hypertensive mice had an aortic systolic pressure of  $114 \pm 1$  mm Hg and a ventricular systolic pressure of  $117 \pm 2$  mm Hg compared to NT with  $95 \pm 1$  mm Hg and  $98 \pm 1$  mm Hg, respectively (Fig. S8).

**Polymerase Chain Reaction.** CaMKII $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  and  $\gamma$  expression in MA and freshly isolated ECs from MA (adapted from Segal S.S, et al. 2011(42)) was probed using primers tested on brain mRNA. Relative expression of all CaMKII isoforms was also evaluated in MA of AH mice. Brain mRNA was extracted using RNeasy Lipid Tissue mini kit (Qiagen) whereas mesenteric arteries (MA) mRNA were extracted with RNeasy micro kit (Qiagen). Endothelial cell (ECs) tubes were freshly isolated from MA as described in Segal S.S. et al.(42). MA segments were transferred in a tube containing 500  $\mu$ l of dissociation buffer (pH 7.4, 137 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, 2 mM CaCl<sub>2</sub>) with enzymes (0.1% BSA, 0.62 mg/ml papain (Sigma, P4762), 1.5 mg/ml collagenase (Sigma, C8051) and 1.0 mg/ml dithiothreitol (DTT). MA were then moved to enzyme-free solution after 25 minutes incubation at 37°C and gently triturated. ECs tubes were collected using a capillary tube. ECs mRNA was extracted and purified (RNeasy Plus micro kit, Qiagen) before



amplification using MessageBOOSTER Whole Transcriptome cDNA synthesis kit for qPCR (Epicenter Biotechnologies). Brain and MA cDNA was synthesized using iScript cDNA synthesis kit (Biorad). Real time PCR was made with MX3005 Stratagene Instrument using iTaq fast Syber Green with ROX (Bio-rad). Specific primers for cyclophilin A, CaMKII $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  and  $\gamma$  were designed to be introns-spanning using Clone Manager Professional Suite (Sci Ed Central). All amplicon sequences were migrated on a 3% agarose gel and confirmed by sequencing. Relative expression was calibrated and normalized to cyclophilin A.

Gene	FWD primer (5' to 3')	REV primer (5' to 3')	Amplicon size (bps)
CaMKII $\alpha$ (NM_177407.4)	CACCACCATTGAGGACGAAGA	GGCTGTCATTCCAGGGTCGC	133
CaMKII $\beta$ (NM_001174053.1)	GAAAGCAGATGGAGTCAAGCC	GTTGTGTTGGTGCTGTCTCGGAA	162 117 (variant 1)
CaMKII $\delta$ (NM_001025439.1)	GGTGAGAAGATGTATGAAAATCCCT	GCTTCAAGAGACGGCAGATTCTA	143
CaMKII $\gamma$ (NM_178597.4)	TGTGCGTCTCCATGACAGTA	CATGCTGGTGGATGTGGTTA	173
Cyclophilin A (PPIA) (NM_008907.1)	CCGATGACGAGCCCTTGG	GCCGCCAGTGCCATTATG	191

**Western Blot.** MA immersed in ice-cooled acetone (10% trichloroacetic acid, 10 mM DTT) were lyophilized and heated at 95°C for 10 minutes in SDS-gel sample buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 0.1 M DTT) (43, 44) . Overnight on a rotator at 4°C allows an optimal protein extraction. Brain protein extraction was made using a standard lysis buffer (50 mM Tris, 20 mM B-glycerophosphate, 20 mM NaF, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1% Triton X-100, 10  $\mu$ g/mL Leupeptin, 10 mM Benzamidine, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ M Microcystin LR, 1 mM Sodium

orthovanadate). Proteins were separated on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis gel (SDS-PAGE) and transferred at 100V for 90 minutes on nitrocellulose membrane. Membranes were then blocked for 2 hours at room temperature in 5% none-fat dry milk (5% NFDM/TBST 1X) before an overnight incubation at 4°C in 1% NFDM/TBST 1X with the primary antibody (CaMKII $\alpha$  Abcam Cat. No. ab50202; CaMKII $\beta$  Abcam Cat. No. ab22131; CaMKII $\delta$  Proteintech Cat. No. 20667-1-AP; CaMKII $\gamma$  Santa Cruz Cat. No. sc-1541). Membranes were incubated with their respective HRP-conjugated secondary antibody for 2 hours at room temperature. Positive antibody binding was visualized using Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer). Brain tissue was used as control.

**Immunohistochemistry.** MA were cut lengthwise and pinned on a Sylgard block in HEPES solution (134 mM NaCl, 6 mM KCl, 10 mM glucose, 10 mM Hepes, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4), endothelium facing up as previously (19). For Ca<sup>2+</sup> pulsars-specific stimulation, MA were first incubated 15 minutes with phenylephrine (PE 10  $\mu$ M) to stimulate Ca<sup>2+</sup> pulsars or pre-incubated with a CaMKII inhibitor KN-93 (10  $\mu$ M, 15 minutes), whereas arteries from NT and AH mice were directly fixed with 4% paraformaldehyde (20 minutes). Tissue were then permeabilized with 0.2 % Triton X-100 and simultaneously blocked with 4 % normal donkey serum. Arteries were incubated overnight at 4°C with the same primary antibodies as those used for Western Blot (CaMKII $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  and  $\gamma$ ), with a specific antibody for phosphorylated CaMKII (CaMKII T286 Badrilla, Cat. No. A010-50) or for calnexin, an endoplasmic reticulum membrane marker (Calnexin Abcam Cat. No. ab22595), CD31 (Santa Cruz Cat. No. sc-1506), an endothelial plasma membrane marker, Golgin-97 (Abcam Cat. No. ab84340), a golgi apparatus marker and pNOS3 (Ser1177) (Cell Signaling Cat. No. 95715). Several antibodies were tested for CaMKII $\alpha$  (Abcam Cat. No. ab92332; Santa Cruz Cat. No. sc-13141),  $\beta$  (Abcam Cat. No. ab34703; Proteintech Cat. No. 11533-1-AP) and  $\gamma$  (Proteintech Cat. No. 12666-2-AP). Arteries were incubated 1 hour at room temperature with fluorescent secondary antibody (Alexafluor 647, Invitrogen, ex/em: 647/670 nm) and mounted in 4% Dabco (1/10 glycerol) on a FluoroDish. Autofluorescence of the internal elastic lamina (IEL) was assessed at ex/em 488/520 nm and DAPI staining at 405/460 nm. Images were recorded in z-stacks (0.25 mm increments) using a Zeiss LSM 510 system confocal microscope (63X oil objective, numerical aperture of 1.4). For 3D volume rendering, image stacks were

deconvolved using the Maximum Likelihood estimation algorithm and the appropriate experimentally determined Point Spread Function (PSF) with Huygens Professional software 3.6 (Scientific Volume Imaging, Netherlands). Images were reconstructed using Zen 2009 light edition. Endothelial CaMKII and calnexin distribution within holes in IEL, known as fenestrations, from deconvolved 3D stacks was analyzed using ATIFIsNI, a custom-designed algorithm developed in Matlab v7.0.1 (The Mathworks inc., MA) (Fig. S9). All experiments were repeated with arteries harvested from a minimum of 2 mice for each condition and images were acquired from 3 to 5 arteries.

### **ATIFIsNI algorithm - Fluorescence distribution within the internal elastic lamina.**

#### *Determination of a 2D surface for the internal elastic lamina*

The 3D fluorescence signal of the internal elastic lamina (IEL) is first treated as a set of slices transverse to the IEL. A dilation procedure with a 30-pixel line-structuring element is first applied to fill empty spaces left by holes in the IEL. The image is binary transformed with fluorescence level greater than a threshold  $\beta$  set to 1. Clusters of connected pixels (4-pixel connectivity) of the binary image consisting of more than 400 pixels are kept to create a mask. A composite image of the masked fluorescence is calculated by linear scaling of the fluorescence value as a function of position along the z-axis to maximize fluorescence of the IEL and discriminate from the non-dense fluorescence mesh found below the smooth muscle cell layer. The scaling function is defined as a relative position where the maximum is set to the endothelium side and minimum on the smooth muscle cell side. Application of threshold  $\alpha$  yield to identification of selected clusters of the IEL for reconstruction by a smooth 2D surface (Fig. S9A (a) for the surface and (b) for the mapped fluorescence) using a modified ridge estimator where the bias is toward smoothness (45). Non-default parameter options used are: smooth (500), interp (bilinear), and regularizer (gradient). A triangular mesh was obtained using the surface function and IEL fluorescence intensity mapped on the surface through the confocal image volume using the slice function. Both  $\alpha$  and  $\beta$  are parameters that are scanned to maximize the distribution intensity of fluorescence on the fitted surface. Binary separation between the IEL (Fig. S9B, a) and holes (Fig. S9B, b) in the IEL estimated surface was obtained by threshold of the fluorescence intensity on the triangular mesh. Threshold value  $I_{thr}$  was selected based on the distribution of intensities, which show characteristics of a dual

distribution corresponding to holes (low intensity and low number of vertices) and lamina (high intensity and high number of vertices). Threshold value was selected as the minimum populated intensity between the two distribution peaks (based on the pixel bin vector with values between 0 and 255, inclusively).

*Estimation of CaMKII- and calnexin-associated fluorescence through the internal elastic lamina holes*

Triangular elements were classified as hole elements if the intensity of at least 2 out of 3 vertices is lower than the intensity threshold  $I_{thr}$ . A cumulated CaMKII- or calnexin-associated fluorescence through IEL holes (Fig. S9C) is calculated based on the assumption that for a given hole, the set of triangular elements corresponds to the transverse section of the hole and that the hole has the same structure throughout its depth. More precisely, vertices values of the composite image are estimated by adding 20 slices of projected CaMKII- or calnexin-associated fluorescence over 2 microns (1 micron below and 1 micron above estimated IEL surface).

**High-speed confocal imaging.**  $Ca^{2+}$  and NO imaging were performed with a Revolution Andor confocal system (Andor Technology). Images were acquired at  $\approx 15$  frames/sec (ex/em 488/510) using Andor iQ 2.8 software (Andor Technology) with an iXon EMCCD camera on an upright Nikon microscope and a 60X, water-dipping objective (NA 1.0). All experiments were performed at 37°C in an oxygenated (12%  $O_2$ , 5%  $CO_2$ ) physiological salt solution (PSS; 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 24 mM  $NaHCO_3$ , 1.2 mM  $KH_2PO_4$ , 1.2 mM  $MgCl_2$ , 11 mM Glucose and 1.5 mM  $CaCl_2$ ). Endothelial  $Ca^{2+}$  imaging of MA was acquired from control and arterial hypertensive (AH) GCaMP2 mice (41). Whereas, MA for endothelial NO measurements were loaded with the NO-sensitive dye 4-amino-5-methylamino-2-7-difluorofluorescein (DAF-FM 20  $\mu M$ ; 30 minutes at 37°C). PE (10  $\mu M$ ) was used to study  $Ca^{2+}$  pulsars stimulation and its implication on NO production. Pre-incubation with KN-93 (10  $\mu M$ ; 10 minutes), a CaMKII inhibitor was used to study CaMKII contribution to endothelial NO production. A NO donor (SNP 10  $\mu M$ ) was used as a positive control for NO experiments, whereas NOS inhibitor (L-NAME 10  $\mu M$ ) was used for a negative control. Carbenoxolone (Carb 10  $\mu M$ ) was used to inhibit gap junctions.  $Ca^{2+}$  pulsars and DAF-FM fluorescence were

analyzed using SparkAn software (A. Bonev, UVM) by measuring the fluorescence intensity ( $F$ ) relative to baseline ( $F_0$ ).  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars fractional fluorescence ( $F/F_0$ ) was evaluated using a  $5 \times 5$  pixel box region of interest (ROI) positioned at the peak pulsar amplitude, whereas DAF-FM fluorescence were measured using a drawn ROI of individual ECs.

**Adeno-associated viral silencing of CaMKII $\alpha$  and  $\beta$ .** Endothelial CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  expression knockdown was carried out with short hairpin RNA (shRNA) delivered through adeno-associated virus serotype 1 (AAV-1) in C57Bl/6 mice. Single stranded cDNAs containing different shRNA (sh-CaMKii  $\alpha$ : 5'-taaccctcactaaagggactcaagcttttccaaaaaatcttctgagagcaccaacacctcttgagtgttggtgctctcagaagatggatccatcgagccctatagtgagtcgtatta-3'; sh-CaMKii  $\beta$ : 5'-taaccctcactaaagggactcaagcttttccaaaaaatgagccttgtaggtgtacacaaactcttgattgtacacctacaaggetcaggatccatcgagccctatagtgagtcgtatta-3'; scramble: 5'-taaccctcactaaagggactcaagcttttccaaaaaacctaagggttaagtcgccctcgctcttgacgagggcgacttaaccttaggcggatccatcgagccctatagtgagtcgtatta) flanked by HindIII and BamHI sites and 2 linkers were purchased from IDT (Coralville, USA) and amplified by PCR using forward and reverse linker primers. Double stranded amplicons were digested with the 2 restriction sites, gel purified and ligated in pU6 ITR followed by transformation in Stbl3 bacteria. All used clones were confirmed by sequencing. Next, shRNA plasmids were packaged into AAV1 by [transfection](#) into human embryonic kidney 293 T cells with pshRNA and pXYZ1 plasmids (ratio 1:2) using polyethylenimine. After 3 days, cells were harvested and lysed by three freeze-thaw cycles in a buffer containing 150 mM of sodium chloride and 50 mM of tris, pH 8.5. Cells were next incubated with 50 U/mL of benzonase for 45 minutes at 37°C and centrifuged to remove cell debris. The crude lysate was overlay onto a 25%, 40%, 60% [iodixanol](#) step gradient and then centrifuged at 33,000g for 3 hours at 4°C. The AAV were carefully collect at the 60%-40% interphase and diluted in cleaning solution (NaCl 136 mM, KCl 2.6 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM and 0,001% Tween). Finally, AAV were concentrated and purified on Amicon 100K filter columns (Millipore, Billerica, Massachusetts) and store at 4°C until injection. Mice were injected intravenously with  $75\text{-}100 \cdot 10^9$  infective units of each AAV-sh viruses and sacrificed 3 weeks later.

**Statistical analysis.** Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 5 software and data is presented as mean  $\pm$  SEM. Unpaired t-test or ANOVA followed by Bonferroni post-test were used for statistical comparisons when appropriate. Values were considered significantly different at  $P < 0.05$ .

## REFERENCES

1. T. Tobimatsu, H. Fujisawa, Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *The Journal of biological chemistry* **264**, 17907-17912 (1989).
2. J. Backs, K. Song, S. Bezprozvannaya, S. Chang, E. N. Olson, CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of clinical investigation* **116**, 1853-1864 (2006).
3. I. A. Greenwood, J. Ledoux, N. Leblanc, Differential regulation of Ca(2+)-activated Cl(-) currents in rabbit arterial and portal vein smooth muscle cells by Ca(2+)-calmodulin-dependent kinase. *The Journal of physiology* **534**, 395-408 (2001).
4. D. J. Bare, C. S. Kettlun, M. Liang, D. M. Bers, G. A. Mignery, Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *The Journal of biological chemistry* **280**, 15912-15920 (2005).
5. J. DeSantiago, L. S. Maier, D. M. Bers, Phospholamban is required for CaMKII-dependent recovery of Ca transients and SR Ca reuptake during acidosis in cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* **36**, 67-74 (2004).
6. P. D. Swaminathan, A. Purohit, T. J. Hund, M. E. Anderson, Calmodulin-dependent protein kinase II: linking heart failure and arrhythmias. *Circulation research* **110**, 1661-1677 (2012).
7. M. H. Yousif, S. Akhtar, T. Walther, I. F. Benter, Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in development of vascular dysfunction in diabetic rats with hypertension. *Cell biochemistry and function* **26**, 256-263 (2008).
8. M. H. Yousif, I. F. Benter, S. Akhtar, Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II normalizes diabetes-induced abnormal vascular reactivity in the rat perfused mesenteric vascular bed. *Autonomic & autacoid pharmacology* **23**, 27-33 (2003).
9. H. Cai, D. Liu, J. G. Garcia, CaM Kinase II-dependent pathophysiological signalling in endothelial cells. *Cardiovascular research* **77**, 30-34 (2008).
10. H. A. Singer, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II function in vascular remodelling. *The Journal of physiology* **590**, 1349-1356 (2012).

11. P. De Koninck, H. Schulman, Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Science* **279**, 227-230 (1998).
12. K. U. Bayer, P. De Koninck, H. Schulman, Alternative splicing modulates the frequency-dependent response of CaMKII to Ca(2+) oscillations. *The EMBO journal* **21**, 3590-3597 (2002).
13. H. Li *et al.*, Histamine upregulates gene expression of endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells. *Circulation* **107**, 2348-2354 (2003).
14. I. Fleming, B. Fisslthaler, S. Dimmeler, B. E. Kemp, R. Busse, Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circulation research* **88**, E68-75 (2001).
15. J. C. Schneider *et al.*, Involvement of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in endothelial NO production and endothelium-dependent relaxation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **284**, H2311-2319 (2003).
16. H. Cai, M. E. Davis, G. R. Drummond, D. G. Harrison, Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II/janus kinase 2-dependent pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **21**, 1571-1576 (2001).
17. S. Dimmeler *et al.*, Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* **399**, 601-605 (1999).
18. T. Kobayashi *et al.*, Involvement of CaM kinase II in the impairment of endothelial function and eNOS activity in aortas of Type 2 diabetic rats. *Clinical science* **123**, 375-386 (2012).
19. J. Ledoux *et al.*, Functional architecture of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in restricted spaces of myoendothelial projections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 9627-9632 (2008).
20. R. Wang, R. Sauve, J. de Champlain, Abnormal regulation of cytosolic free calcium in vascular endothelial cells from spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension* **13**, 993-1001 (1995).
21. K. Shen, T. Meyer, Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation. *Science* **284**, 162-166 (1999).



22. M. A. Deli *et al.*, Calcium/calmodulin-stimulated protein kinase II is present in primary cultures of cerebral endothelial cells. *Journal of neurochemistry* **60**, 1960-1963 (1993).
23. C. H. Tran *et al.*, Endothelial Ca<sup>2+</sup> wavelets and the induction of myoendothelial feedback. *American journal of physiology. Cell physiology* **302**, C1226-1242 (2012).
24. L. W. Nausch *et al.*, Sympathetic nerve stimulation induces local endothelial Ca<sup>2+</sup> signals to oppose vasoconstriction of mouse mesenteric arteries. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **302**, H594-602 (2012).
25. B. E. Isakson, S. I. Ramos, B. R. Duling, Ca<sup>2+</sup> and inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated signaling across the myoendothelial junction. *Circulation research* **100**, 246-254 (2007).
26. S. L. Sandow, M. Tare, H. A. Coleman, C. E. Hill, H. C. Parkington, Involvement of myoendothelial gap junctions in the actions of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation research* **90**, 1108-1113 (2002).
27. K. A. Dora, N. T. Gallagher, A. McNeish, C. J. Garland, Modulation of endothelial cell KCa3.1 channels during endothelium-derived hyperpolarizing factor signaling in mesenteric resistance arteries. *Circulation research* **102**, 1247-1255 (2008).
28. A. C. Straub *et al.*, Compartmentalized connexin 43 s-nitrosylation/denitrosylation regulates heterocellular communication in the vessel wall. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **31**, 399-407 (2011).
29. N. M. Tsoukias, M. Kavdia, A. S. Popel, A theoretical model of nitric oxide transport in arterioles: frequency- vs. amplitude-dependent control of cGMP formation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **286**, H1043-1056 (2004).
30. L. C. Griffith, C. S. Lu, X. X. Sun, CaMKII, an enzyme on the move: regulation of temporospatial localization. *Molecular interventions* **3**, 386-403 (2003).
31. K. Shen, M. N. Teruel, K. Subramanian, T. Meyer, CaMKIIbeta functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKIIalpha/beta heterooligomers to dendritic spines. *Neuron* **21**, 593-606 (1998).

32. H. Cai, J. S. McNally, M. Weber, D. G. Harrison, Oscillatory shear stress upregulation of endothelial nitric oxide synthase requires intracellular hydrogen peroxide and CaMKII. *Journal of molecular and cellular cardiology* **37**, 121-125 (2004).
33. C. Alev *et al.*, The neuronal connexin36 interacts with and is phosphorylated by CaMKII in a way similar to CaMKII interaction with glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 20964-20969 (2008).
34. R. Y. Huang *et al.*, Identification of CaMKII phosphorylation sites in Connexin43 by high-resolution mass spectrometry. *Journal of proteome research* **10**, 1098-1109 (2011).
35. A. A. Aromolaran, L. A. Blatter, Modulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> release and capacitative Ca<sup>2+</sup> entry by CaMKII inhibitors in bovine vascular endothelial cells. *American journal of physiology. Cell physiology* **289**, C1426-1436 (2005).
36. F. Toussaint, C. Charbel, A. Blanchette, J. Ledoux, CaMKII regulates intracellular Ca(2)(+) dynamics in native endothelial cells. *Cell calcium* **58**, 275-285 (2015).
37. J. Ledoux, M. T. Nelson, SK channels are involved in the stimulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> signals by reactive oxygen species (ROS) in intact endothelium. *The FASEB Journal*. **20**, A1164-A1165 (2006).
38. J. R. Erickson *et al.*, A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* **133**, 462-474 (2008).
39. H. Girouard, A. Lessard, C. Capone, T. A. Milner, C. Iadecola, The neurovascular dysfunction induced by angiotensin II in the mouse neocortex is sexually dimorphic. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **294**, H156-163 (2008).
40. S. L. Sandow, N. J. Bramich, H. P. Bandi, N. M. Rummery, C. E. Hill, Structure, function, and endothelium-derived hyperpolarizing factor in the caudal artery of the SHR and WKY rat. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **23**, 822-828 (2003).
41. Y. N. Tallini *et al.*, Propagated endothelial Ca<sup>2+</sup> waves and arteriolar dilation in vivo: measurements in Cx40BAC GCaMP2 transgenic mice. *Circulation research* **101**, 1300-1309 (2007).

42. M. J. Socha, C. H. Hakim, W. F. Jackson, S. S. Segal, Temperature effects on morphological integrity and  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in freshly isolated murine feed artery endothelial cell tubes. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **301**, H773-783 (2011).
43. R. P. Johnson *et al.*,  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization via phosphorylation of myosin phosphatase targeting subunit at threonine-855 by Rho kinase contributes to the arterial myogenic response. *The Journal of physiology* **587**, 2537-2553 (2009).
44. K. Takeya, K. Loutzenhiser, M. Shiraishi, R. Loutzenhiser, M. P. Walsh, A highly sensitive technique to measure myosin regulatory light chain phosphorylation: the first quantification in renal arterioles. *American journal of physiology. Renal physiology* **294**, F1487-1492 (2008).
45. J. D'Errico. (Matlab Central, <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/8998-surface-fitting-using-gridfit>, 2005).

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful to Roger Hajjar for the generous gift of AAV-1 containing plasmids. Also, assistance in confocal microscopy (Louis R. Villeneuve) and animal handling (Natacha Duquette) was greatly appreciated.

**Funding:** This work was supported by Université de Montreal (C.C., D.B. & F.T.), MHI (C.C. and F.T.), SQHA (F.T. and D.B.), NSERC (P.C.) FRQS (J.L. and P.C.), CIHR, CFI and HSFC (J.L.).

**Author contributions:** CC and JL designed the research; CC, FT and DB performed the experiments; CC and DB analyzed the data; NB and PC contributed reagents; CC and JL wrote the paper.

**Competing interests:** The authors declared that they have no competing interests.

## FIGURE LEGENDS

Fig.1 CaMKII isoforms expression in mice mesenteric arteries. (Ai) Real time PCR amplification plots and amplicons for CaMKII $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  and  $\gamma$  in MA and freshly isolated ECs. Ladder upper bar = 200 bp, lower bar = 150 bp. (Aii) Western Blot detection of CaMKII $\alpha$  (54 kDa),  $\beta$  (67 kDa),  $\delta$  (55 kDa) and  $\gamma$  (55 kDa) in MA and brain. n=3 (B) Intracellular localization of CaMKII(a)  $\alpha$ , (b)  $\beta$ , (c)  $\delta$  and (d)  $\gamma$  (red) in (i) ECs (nuclei, blue), (ii) with the IEL (green) and in (iii) VSMCs (nuclei, blue). Arrows: fluorescence densities of CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  in ECs and within IEL fenestrations. Bar = 10  $\mu$ m. iv. Cross sectional view of z-stacks of images as in i-iii. Bar = 2  $\mu$ m.

Fig.2 Impact of Ca<sup>2+</sup> pulsars stimulation on endothelial CaMKII isoforms localization from freshly isolated mesenteric arteries. (A, B, C) Immunostaining after Ca<sup>2+</sup> pulsars stimulation (PE 10  $\mu$ M; 15 min) of CaMKII $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\delta$  (red) in (a) ECs with (b) the IEL (green). Arrows: fluorescence densities of CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  within IEL fenestrations. Endothelial CaMKII (A, B, C) distribution with a CaMKII inhibitor (KN-93, 10  $\mu$ M) in (c) ECs with (d) the IEL. Bar = 10  $\mu$ m. (e) Cross sectional view of z-stacks of images as in a-b. Bar = 2  $\mu$ m. (D) CaMKII  $\alpha$  (Ctrl, n = 5; PE, n = 5; + KN-93, n = 13),  $\beta$  (Ctrl, n = 8; PE, n = 5; + KN-93, n = 11) and  $\delta$  (Ctrl, n = 5; PE, n = 6; + KN-93, n = 7) clusters densities analysis within IEL fenestrations after PE stimulation. Ctrl, white vs. PE, black vs. KN-93, gray, \* $P < 0.05$ .

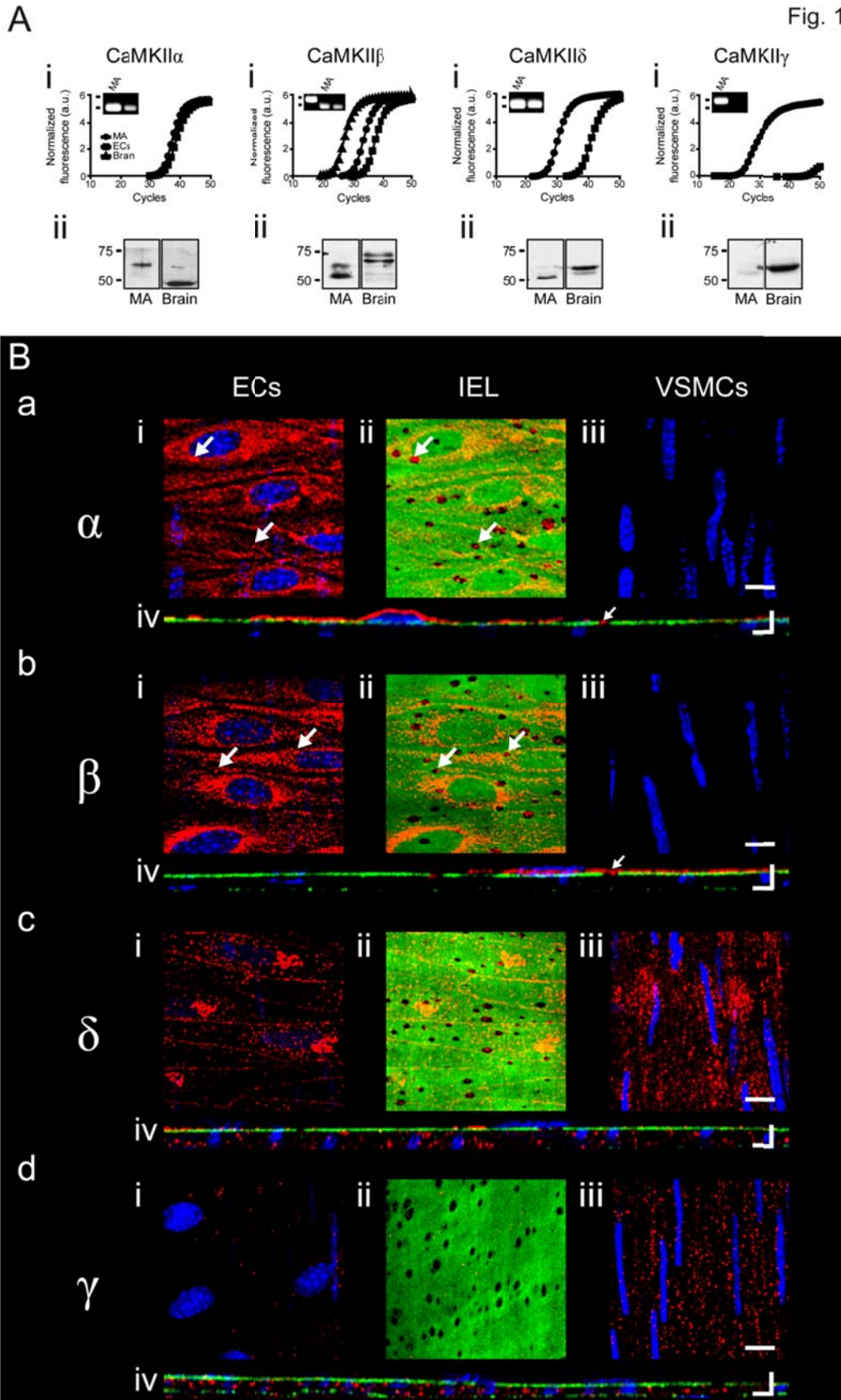
Fig.3 Endothelial activated CaMKII (T286) localization after Ca<sup>2+</sup> pulsar stimulation. (A) Immunostaining for activated CaMKII (T286) (red) in (a) ECs with (b) the IEL (green), after (B) Ca<sup>2+</sup> stimulation (PE 10  $\mu$ M; 15 min). (C) Fluorescence distribution of activated CaMKII in the presence of KN-93 (PE + KN-93 10  $\mu$ M; 15 min) in (a) EC with (b) the IEL. (c) Cross sectional view of z-stacks of images as in a-b. Bar = 2  $\mu$ m. Arrows: fluorescence densities of CaMKII T286 within IEL fenestrations. (D, a) T286 fluorescence density within IEL fenestrations (Ctrl, n = 5; PE, n = 7; + KN-93, n = 7); and (b) percentage of myoendothelial projection (MEP)

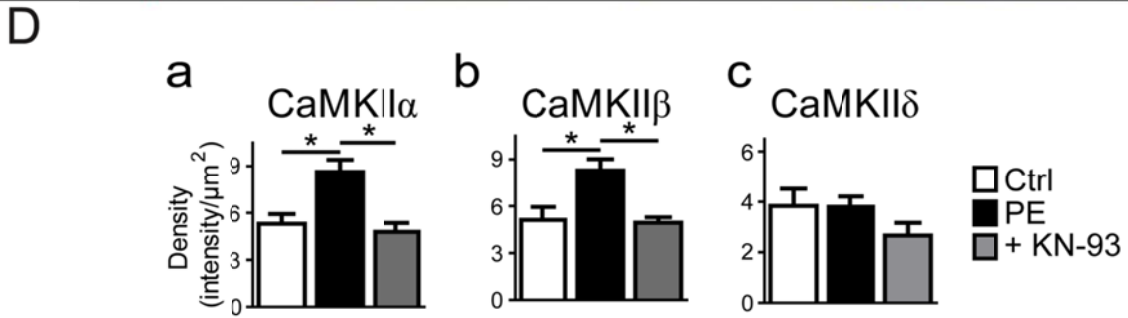
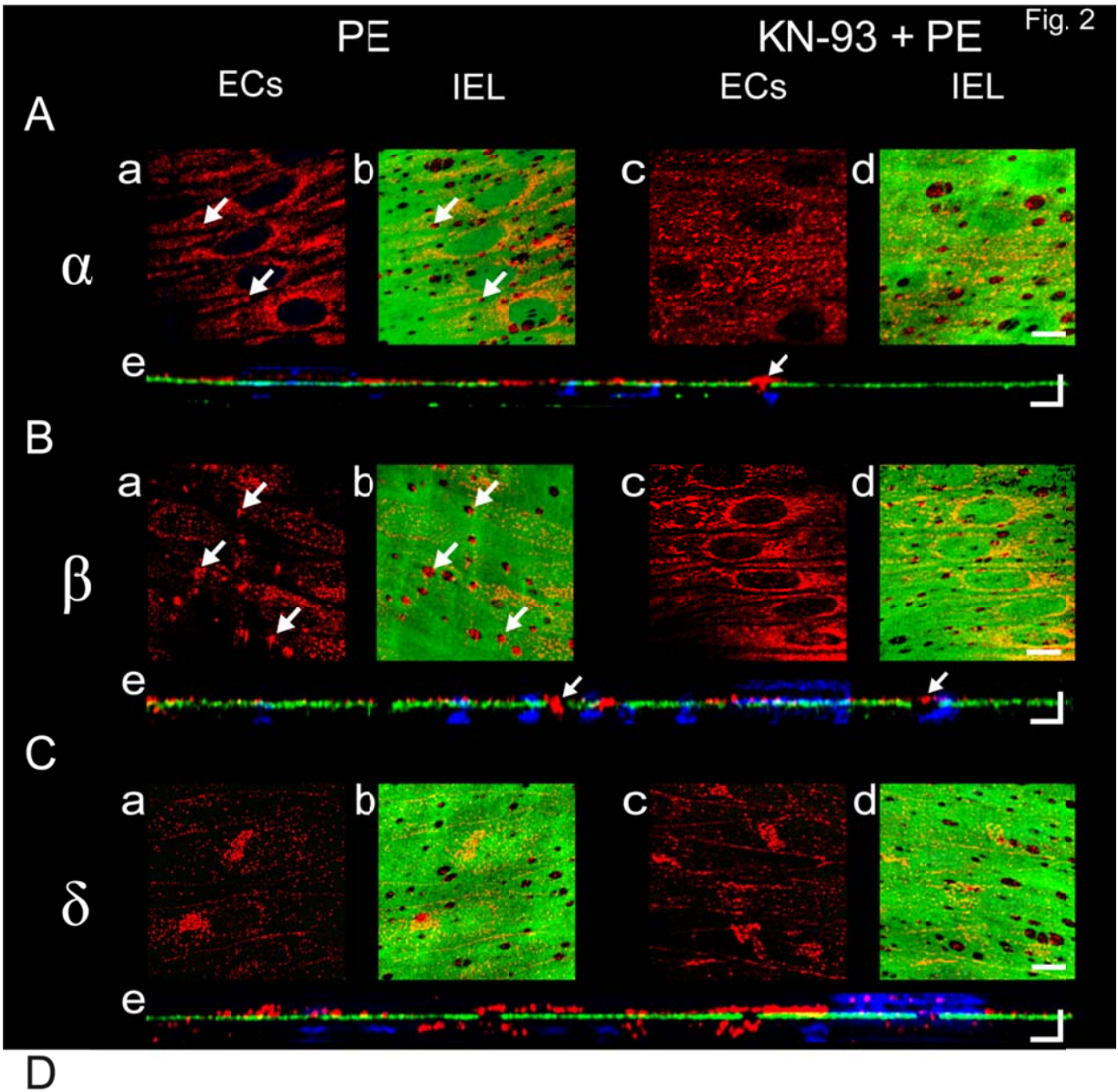
occupation (Ctrl, n= 5; PE, n= 6; + KN-93, n= 7) after PE stimulation. Ctrl, white vs. PE, black vs. KN-93, gray,  $*P < 0.05$ . Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

Fig.4 Stimulation of nitric oxide production in endothelial cells from resistance arteries. (A) Representative images of nitric oxide (NO) production with DAF-FM in ECs from a mesenteric artery (a) before and (b) after exposure to phenylephrine (PE 10  $\mu\text{M}$ ). (B) Representative images of NO production in ECs of an artery pre-incubated with KN-93 (10  $\mu\text{M}$ ; 10 min) (a) before and (b) after exposure to PE (10  $\mu\text{M}$ ). (C) Time course plot of NO production ( $F/F_0$ ) when adding PE (Ctrl), after pre-incubation with KN-93 or a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor (L-NAME). (D) Bar graph illustrating the effect of PE (10  $\mu\text{M}$ ), KN-93 (10  $\mu\text{M}$ ) and the NO donor (SNP 10  $\mu\text{M}$ ,) on NO production in ECs as in A. Ctrl, white, n= 10; PE, black, n= 4; KN-93, gray, n= 6; KN-93 + PE, n= 6. Ctrl vs. PE, KN-93 vs. KN-93-PE and PE vs. KN-93-PE,  $*P < 0.05$ . (E) Bar graph illustrating NO production in pre-incubated artery with L-NAME (10  $\mu\text{M}$ , green, n= 5) or carbenoxolone (Carb 10  $\mu\text{M}$ , blue, n= 4). The NO donor saturated DAF-FM fluorescent signal (SNP, red, n= 19).

Fig.5 Endothelial CaMKII localization in mesenteric arteries from hypertensive mice (A) Immunostaining of CaMKII (a)  $\alpha$ , (b)  $\beta$  and (c)  $\delta$  (red) in (i) ECs with (ii) the IEL (green) from hypertensive mice (AH) and normotensive mice (NT). Bar = 10  $\mu\text{m}$ . Cross sectional views of z-stacks of images from (iv) AH and (v) NT mice as in i-iii. Bar = 2  $\mu\text{m}$ . Arrows: fluorescence densities of CaMKII within IEL fenestrations. (d) CaMKII (i)  $\alpha$  (NT, n= 5; AH, n= 6), (ii)  $\beta$  (NT, n= 7; AH, n= 9) and (iii)  $\delta$  (NT, n= 6; AH, n= 6) clusters densities analysis within IEL fenestrations. NT, white vs. AH, black,  $*P < 0.05$ . (Ba) Fluorescence distribution of activated CaMKII (T286) in (i) ECs with (ii) the IEL in hypertensive (AH) and normotensive mice (NT). Bar = 10  $\mu\text{m}$ . Cross sectional views of z-stacks of images from (iv) AH and (v) NT mice as in i-iii. Bar = 2  $\mu\text{m}$ . Arrows: fluorescence densities of CaMKII T286 within IEL fenestrations. (b) CaMKII T286 percentage of myoendothelial projection (MEP) occupation (NT, n= 7; AH, n= 10) analysis. NT, white vs AH, black,  $*P < 0.05$ , Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

Fig. 1







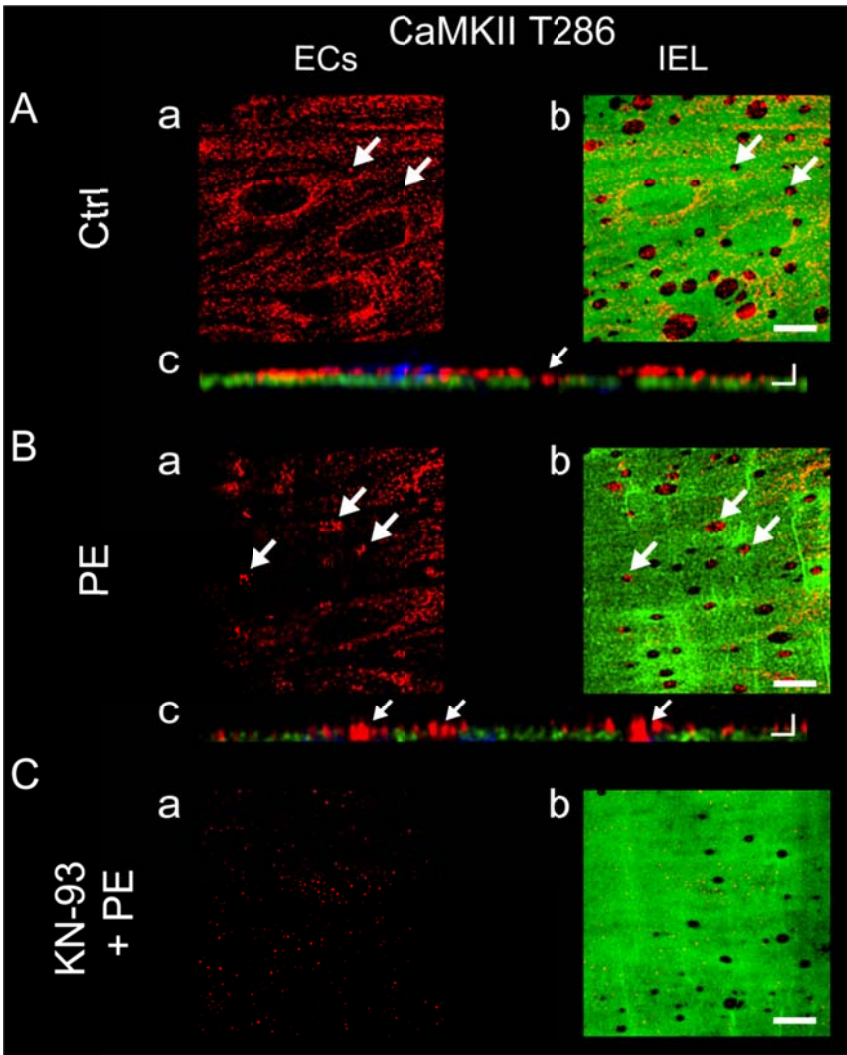
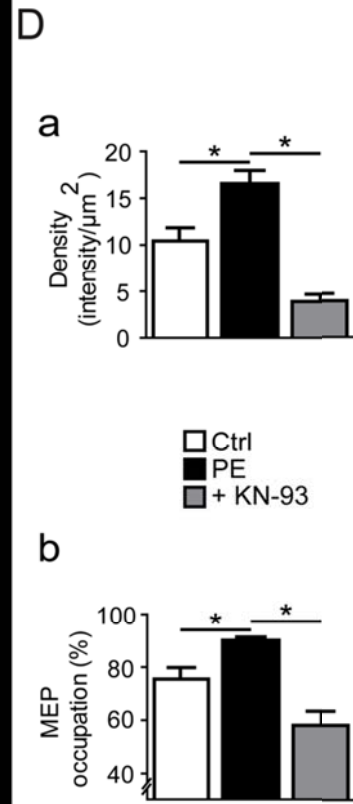
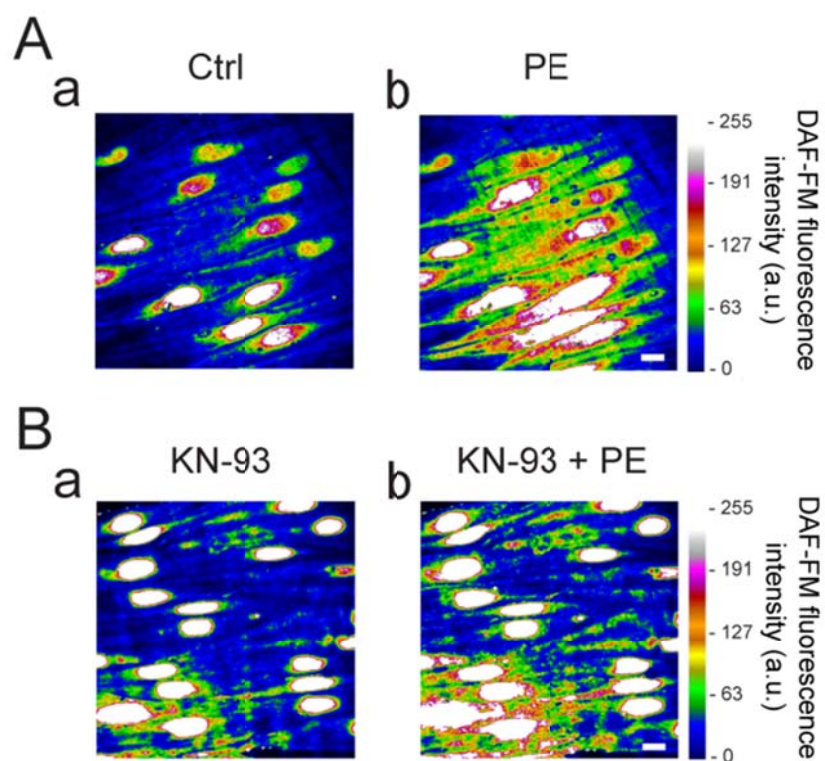
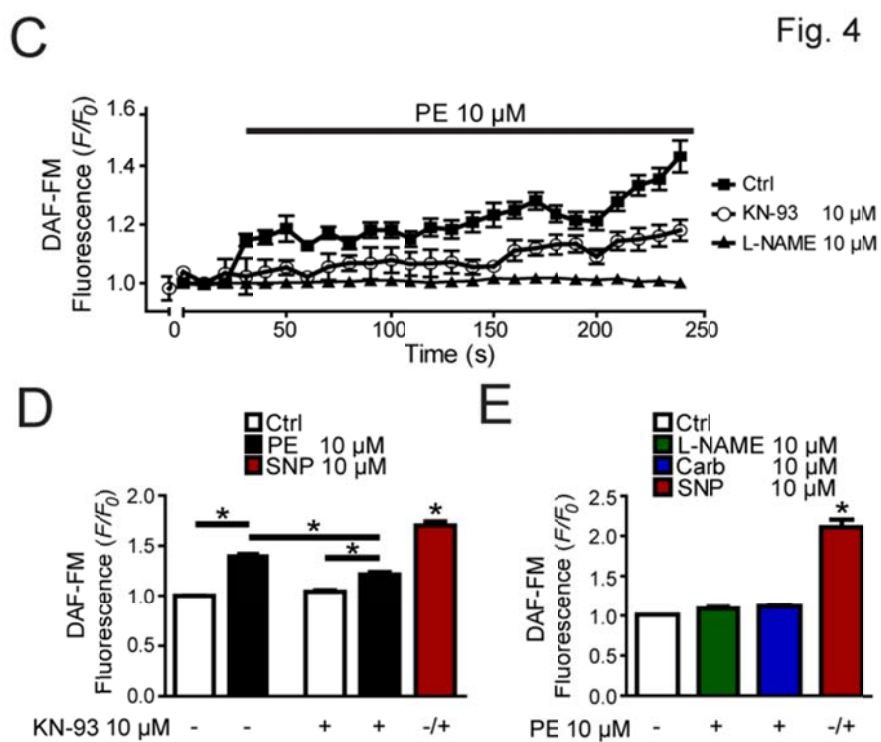


Fig. 3



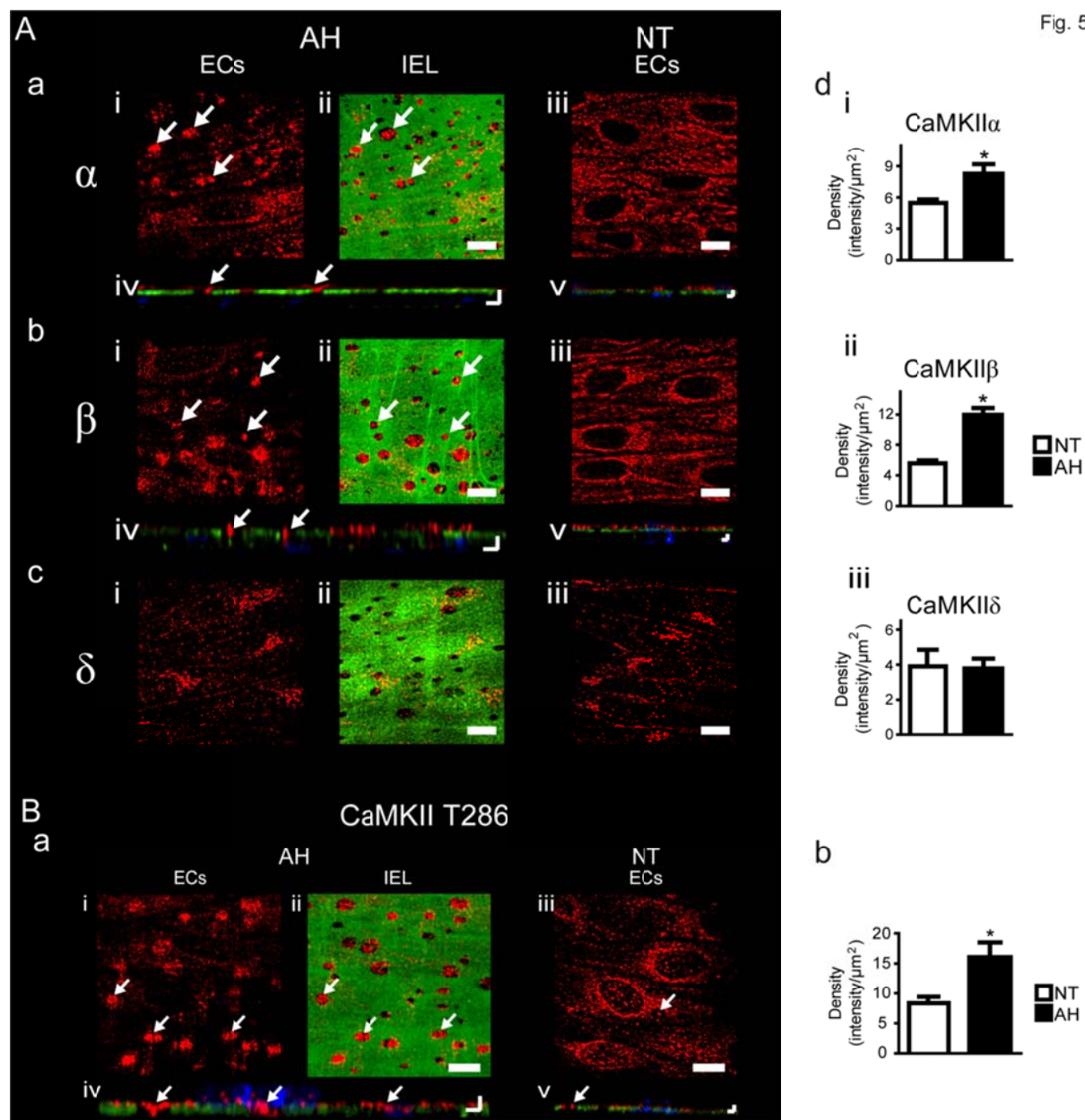


**Fig. 4**



**Fig. 4**

Fig. 5



## SUPPLEMENTAL LEGENDS

**Table S1.** Kinetic parameters of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars in the presence of phenylephrine in mesenteric arteries from GCaMP2 mice.  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars descriptive parameters in terms of frequency, number of active sites, peak amplitude measured as  $F/F_0$ , rise time measured as upstroke time required for 10-90% of the signal, duration measured as the time between 50% of the signal before and after the peak and half-time for decay ( $t_{1/2}$ ) measured as time between the peak and 50% of the amplitude of the signal.  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars parameter values in the presence of phenylephrine (PE 10  $\mu\text{M}$ ) are expressed as percentage of control.  $n=9$ ,  $*p<0.05$ .

**Fig. S1** Endothelial CaMKII $\delta$  distribution in native mesenteric arteries. Endothelial cells (ECs nuclei, blue) staining for (A) the plasma membrane revealed with CD31 (red); (B) the Golgi apparatus with golgin-97 (red); and (C) subcellular distribution for CaMKII $\delta$  isoform. Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. S2** Endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars stimulation by phenylephrine in mesenteric arteries. High-speed confocal imaging of (A)  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars, expressed as a frequency, following exposure to phenylephrine (PE 10  $\mu\text{M}$ , black,  $n=6$ ) and carbenoxolone, a gap junction inhibitor (Carb 10  $\mu\text{M}$ , dark gray,  $n=5$ ). Carb alone did not affect  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars frequency (gray,  $n=5$ ) compared to control (white,  $n=6$ ).  $*p<0.05$ . (B) Endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  waves and (C) global  $\text{Ca}^{2+}$  levels following exposure to phenylephrine (PE 10  $\mu\text{M}$ , black,  $n=3$ ).

**Fig. S3** Distribution of phosphorylated endothelial nitric oxide synthase in mesenteric arteries. (A) Immunostaining of phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (red, pNOS) following exposure to phenylephrine (PE 10  $\mu\text{M}$ ) in the absence (B) and presence (C) of KN-93, a CaMKII inhibitor. White arrows indicate fluorescence densities for pNOS3 in (a) endothelial cells (ECs) and within (b) the internal elastic lamina (IEL, green) fenestrations. Bar = 10  $\mu\text{m}$ . (c) Cross sectional view along the z-axis shows pNOS3 localization within MEPs of mesenteric arteries. Bar = 2  $\mu\text{m}$ . (D) pNOS3 clusters densities analysis within IEL fenestrations after PE stimulation and in presence of KN-93 (Ctrl,  $n=11$ ; PE,  $n=10$ ; + KN-93,  $n=7$ ). Ctrl, white vs. PE, black and KN-93, gray,  $*p<0.05$ .

**Fig. S4** Adeno-associated viral decrease of CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  expression in mesenteric arteries. (A, i) Western blot detection of CaMKII $\alpha$  (54 kDa) (a), CaMKII $\beta$  (67 kDa) (b), and  $\alpha$ -actin, in mesenteric arteries from mice injected with AAV-1 containing either shRNA-targeting CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  or a scrambled shRNA. (ii) Bar graph reporting CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  expression levels normalized to  $\alpha$ -actin in mesenteric arteries from mice injected with AAV-1 containing a scramble shRNA or targeting CaMKII $\alpha$  and  $\beta$ . Scramble, white, n= 3 (CaMKII $\alpha$ ) and n= 2 (CaMKII $\beta$ ); CaMKII $\alpha$ / $\beta$  shRNA, black, n= 4. \* $P$  < 0.05. (B) Bar graph illustrating the effect CaMKII $\alpha$ / $\beta$  shRNA on NO production in ECs as recorded with DAF-FM fluorescence (percentage of control) following exposure to PE (10  $\mu$ M). Scramble, white, n= 7; CaMKII $\alpha$ / $\beta$  shRNA, black, n= 8. \* $P$  < 0.05.

**Fig. S5** Endothelial Ca<sup>2+</sup> pulsars in mesenteric arteries from hypertensive mice. (A) Ca<sup>2+</sup> pulsars and (B) waves frequency recorded with high-speed confocal imaging of *in situ* endothelium of mesenteric arteries from hypertensive mice (AH, black, n= 9) compared to normotensive mice (NT, white, n= 3). \* $p$  < 0.05.

**Fig. S6** Calnexin distribution within the internal elastic lamina of mesenteric artery from arterial hypertensive mice. (A) Fluorescence distribution of calnexin, an endoplasmic reticulum marker, in (a) endothelial cells (ECs) with (b) the internal elastic lamina (IEL) in normotensive (NT, white) and hypertensive (AH, black) (c,d) mice. Bar = 10  $\mu$ m. (B) Bar graph of 3D stacks analysis of calnexin within labeled myoendothelial projection. Percentage of calnexin IEL fenestrations labeling on total IEL fenestrations (a) from NT and AH mice; (b) labeled and (c) total IEL fenestrations surface ( $\mu$ m<sup>2</sup>); (d) total and (e) labeled IEL fenestration per surface ( $\mu$ m<sup>2</sup>) in NT (n= 8) and AH (n= 5) mice. NT vs. AH, \* $p$  < 0.05.

**Fig. S7** Expression of CaMKII isoforms in mesenteric arteries from hypertensive mice. mRNA relative expression of CaMKII (A)  $\alpha$ , (B)  $\beta$ , (C)  $\delta$  and (D)  $\gamma$  in mesenteric arteries from normotensive (NT, white, n= 5) and hypertensive (AH, black, n= 5) mice normalized to cyclophilin A mRNA expression. NT vs AH, \* $P$  < 0.05. (E) A linear regression between mice systolic blood pressure and CaMKII $\beta$  relative expression. n= 10.  $r^2$  = 0.7293, \* $P$  < 0.002.

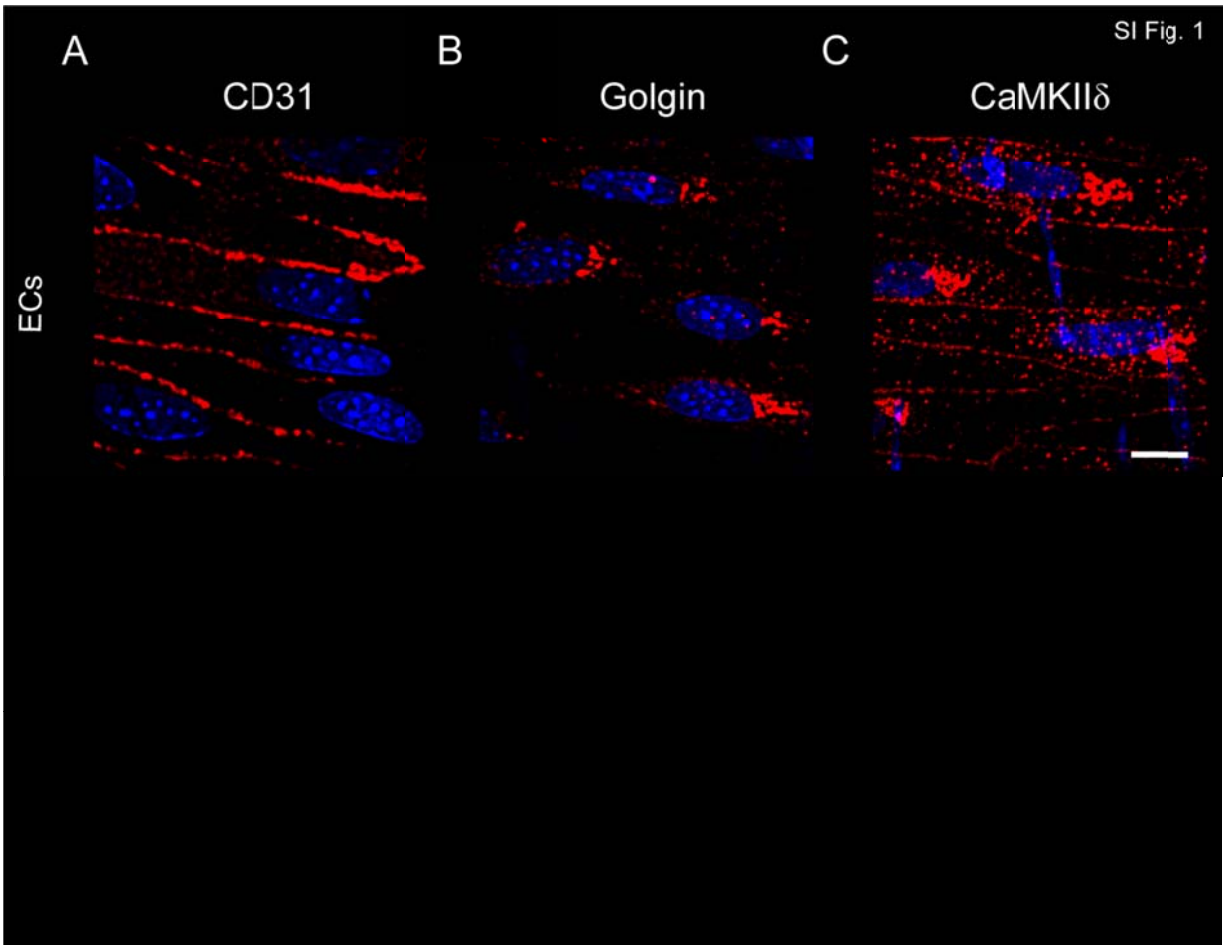
**Fig. S8** Arterial hypertensive mice model with phenylephrine infusion. Arterial hypertension (AH) was induced by chronic infusion of phenylephrine (PE, 40 mg/Kg/d) using osmotic mini-pump. Millar catheter measurements after 7 days of PE or saline infusion of (A) aortic systolic pressure and (B) ventricular systolic pressure in AH (black, n=17) and normotensive (NT, white, n= 13) mice. NT vs. AH \*p< 0.0001.

**Fig. S9** Custom-designed algorithm analyzing CaMKII fluorescence within internal elastic lamina holes in 3D image stacks. (A, a) Continuous surface representation of the internal elastic lamina (IEL) obtained from the 3D fluorescence intensity signals and (b) the mapped fluorescence intensity. (B, a) 2D surface of reconstructed IEL after threshold on intensity and (b) corresponding holes that have been removed. (C) CaMKII fluorescence intensity summed through each IEL holes.

SI Table 1. Kinetic parameters of Ca<sup>2+</sup> pulsars in the presence of phenylephrine in mesenteric arteries from GCaMP2 mice.

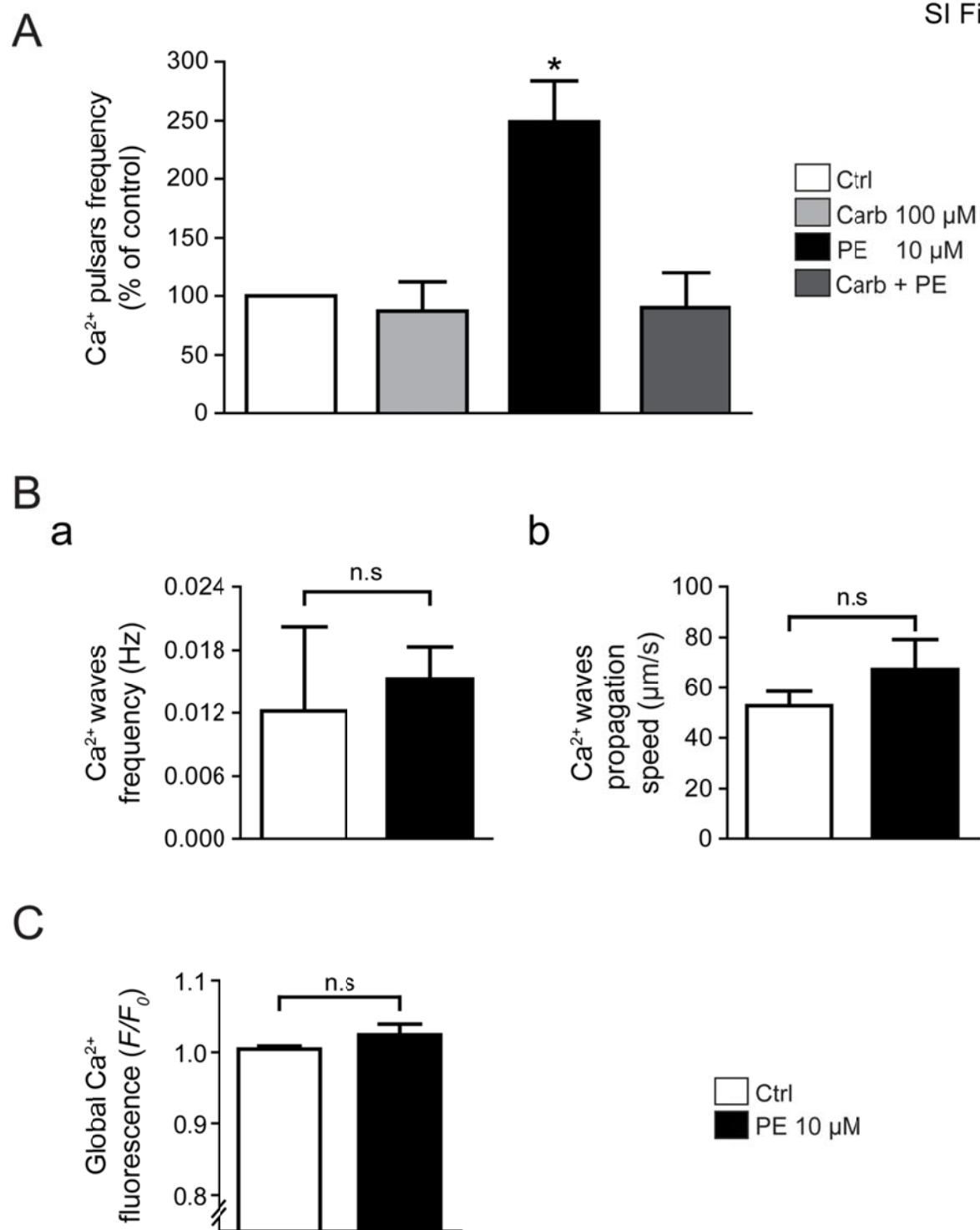
<b>Ca<sup>2+</sup> pulsars Parameters</b>	<b>% of Control</b>	
	Mean	SEM
Frequency	256*	34
Sites	211*	23
Amplitude	134	16
Rise	146	16
Duration	162	28
t <sub>1/2</sub>	132	13

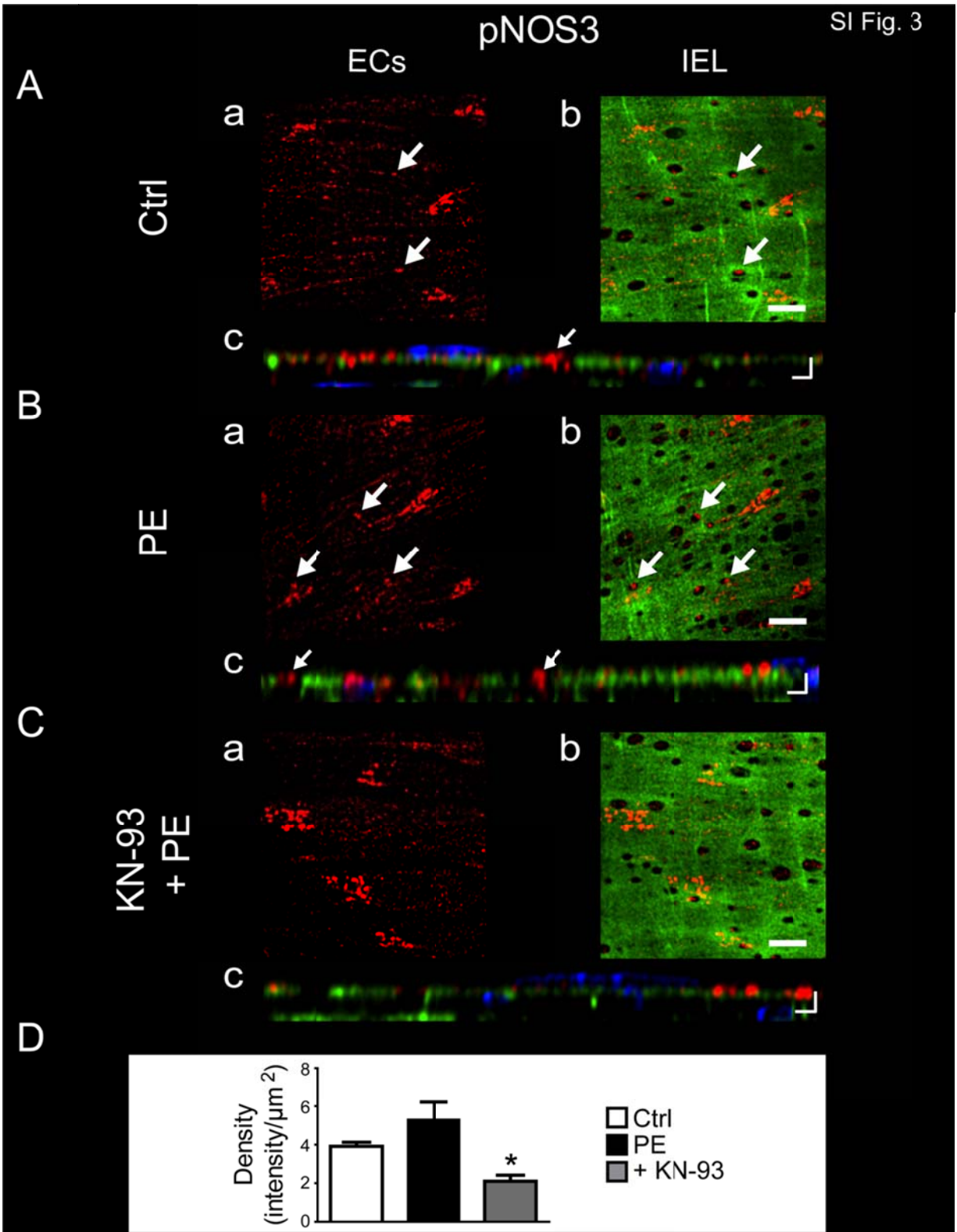
\*p<0.05.





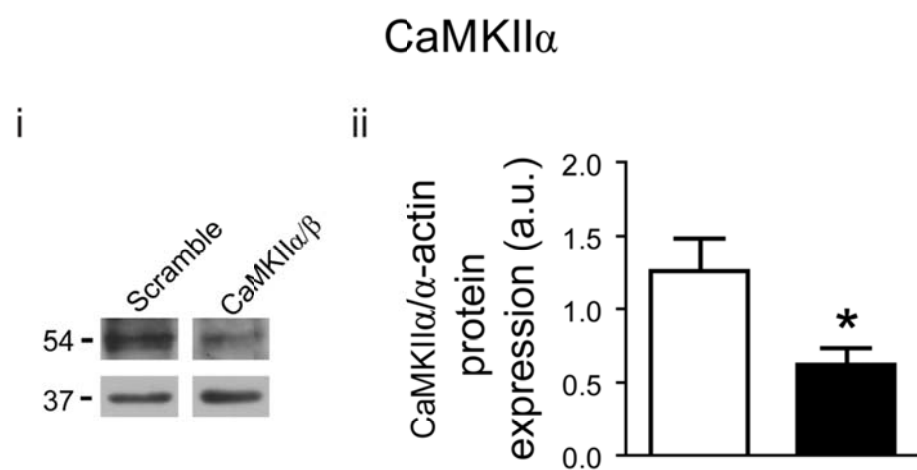
SI Fig. 2



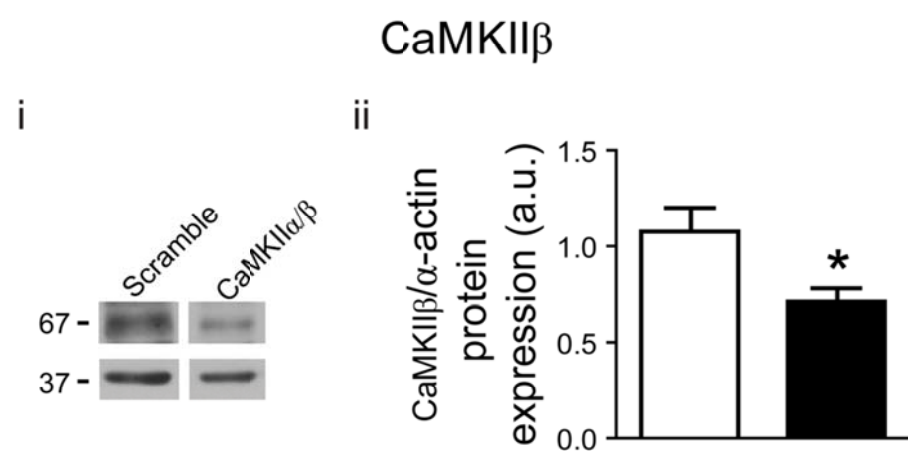


A

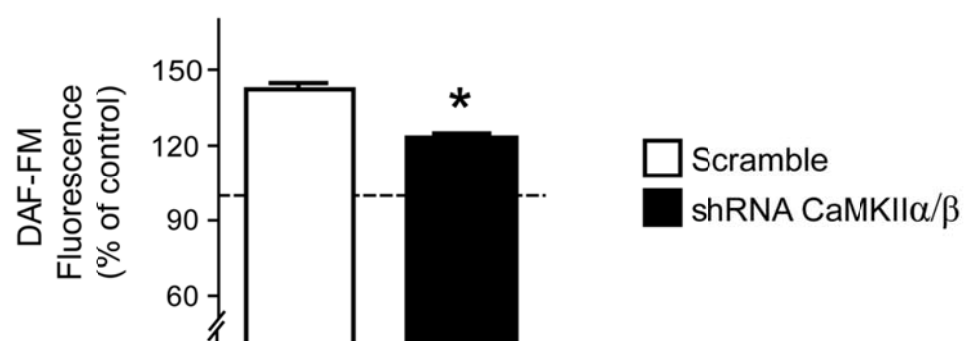
a



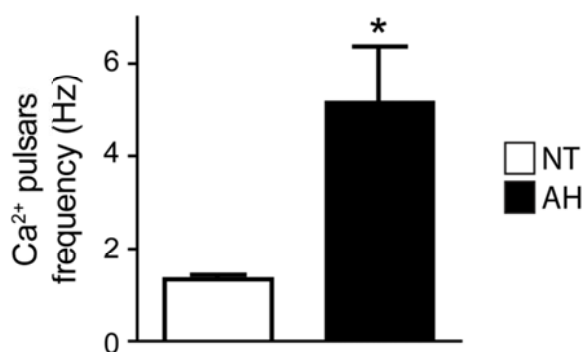
b



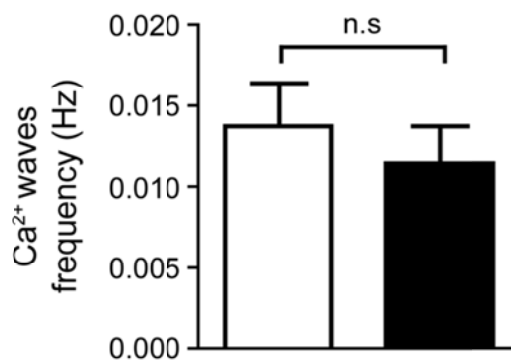
B



A

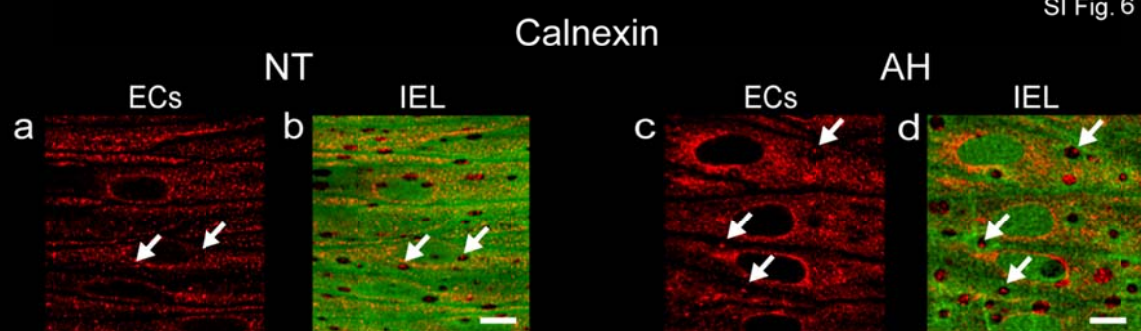


B



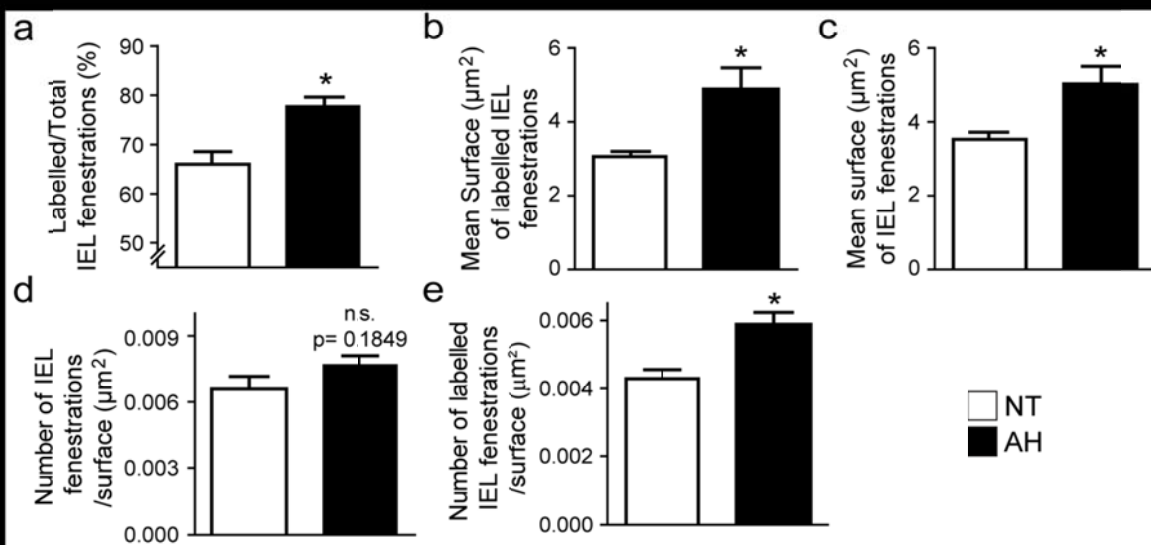
SI Fig. 5

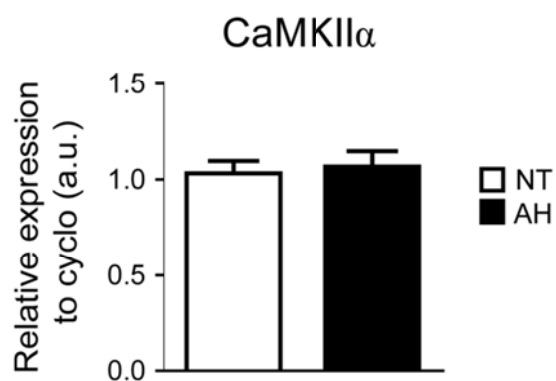
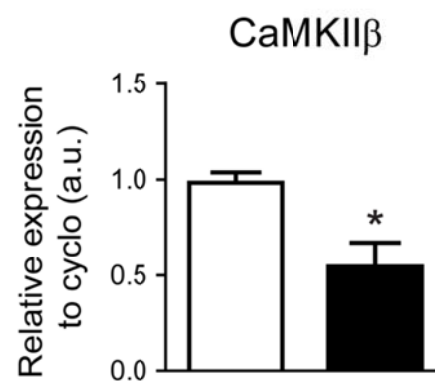
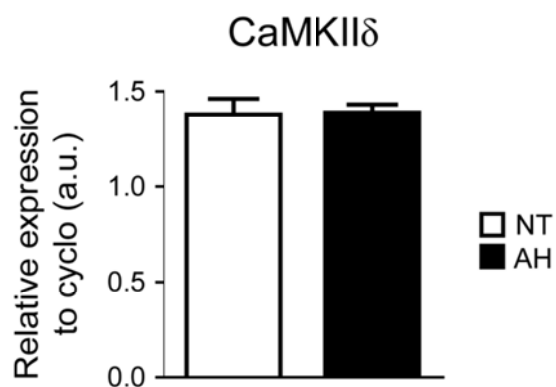
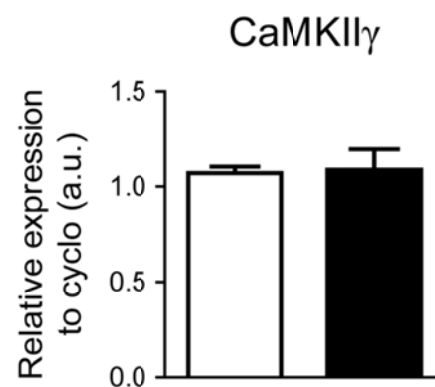
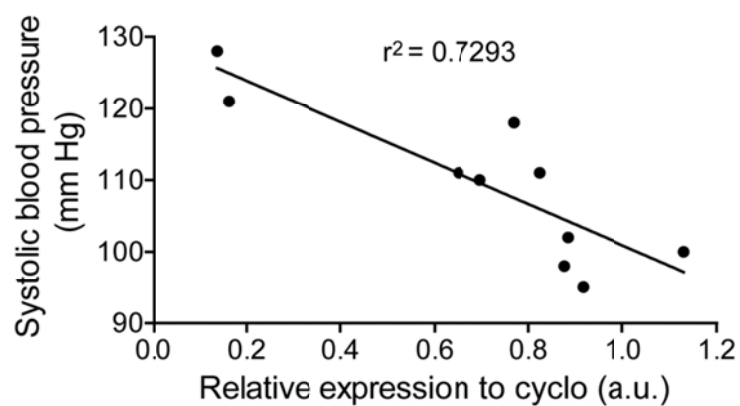
A



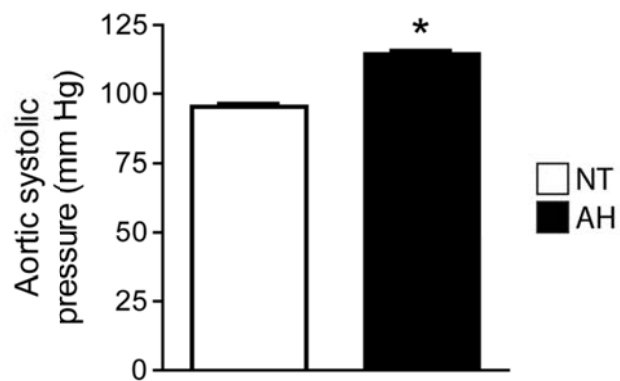
SI Fig. 6

B

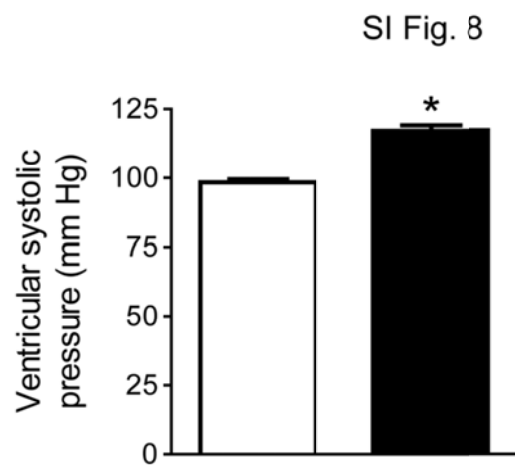


**A****B****C****D****E**

A

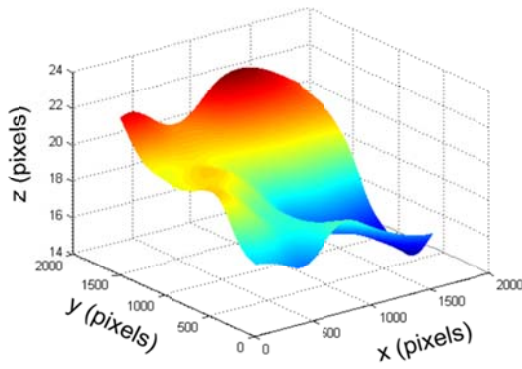


B

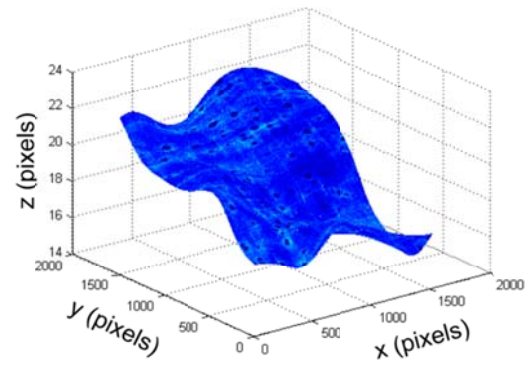


SI Fig. 9

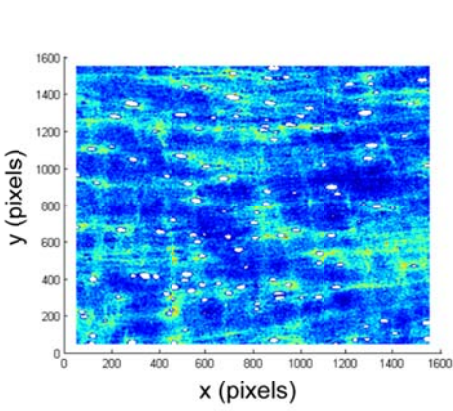
A



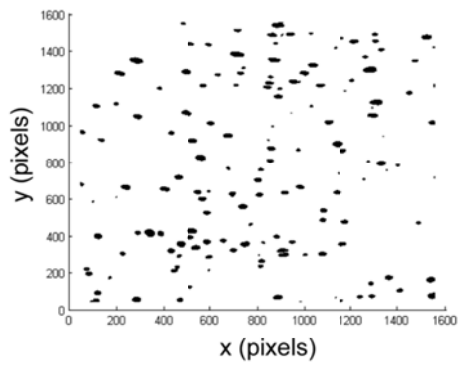
b



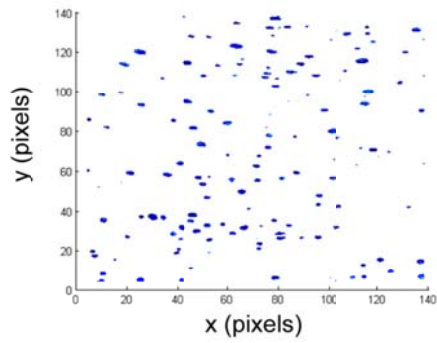
B



b



C



## Article 2

**Charbel C.**, Toussaint F., Gillis M-A., Blanchette A., Ledoux J., New insights on endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains and CaMKII in Angiotensin II-induced hypertension. En préparation.

### Apport original et contribution des coauteurs

Titre : New insights on endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains and CaMKII in Angiotensin II-induced hypertension.

Auteurs : Chimène Charbel, Fanny Toussaint, Marc-Antoine Gillis, Alexandre Blanchette, Philippe Comtois et Jonathan Ledoux.

Ce manuscrit est en préparation pour être soumis à nouveau pour une publication dans une revue scientifique.

#### Contribution des auteurs :

**Chimène Charbel** : Auteure principale du manuscrit ayant élaboré les hypothèses et objectifs du projet, ainsi que la conception et le design expérimental, effectué toutes les expériences, la cueillette et l'analyse des données, l'interprétation des résultats et la préparation complète du manuscrit.

**Fanny Toussaint** : Coauteure ayant effectué des expériences, participé à la cueillette des données d'immunofluorescence et approuvé la version finale du manuscrit.

**Marc-Antoine Gillis** : Coauteur ayant participé à la cueillette et à l'analyse des données hémodynamiques des souris hypertendues.

**Alexandre Blanchette** : Coauteur ayant effectué des expériences, participé à la cueillette des données et approuvé la version finale du manuscrit.

**Philippe Comtois** : Coauteur ayant créé et élaboré le design expérimental d'un algorithme dans Matlab (ATIFIsNI), nécessaire pour la quantification des données d'immunofluorescence et ayant participé à l'approbation de la version finale du manuscrit.



**Jonathan Ledoux** : Directeur de thèse et investigateur principal ayant supervisé l'ensemble du projet et élaboré le design expérimental, l'analyse des données, l'interprétation des résultats et participé à la révision, correction et approbation de la version finale du manuscrit.

## Mise en contexte de l'article 2

De nombreuses études cliniques ont démontré une relation importante entre la dysfonction endothéliale et les maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension. Un point majeur dans cette relation est le rôle de l'AngII dans la régulation de la pression artérielle. AngII participe à la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension par son implication dans l'altération de l'équilibre entre la biodisponibilité du NO et la production de ROS. AngII stimule la production de ROS *in vivo* suite à l'activation des récepteurs AT<sub>1</sub>, contribuant ainsi à l'inactivation du NO et à la dysfonction endothéliale. Toutefois, l'activation des récepteurs AT<sub>2</sub> semble plutôt augmenter la production de NO, pouvant ainsi prévenir la dysfonction endothéliale.

Les ROS ont la capacité de moduler les dynamiques calciques en modifiant les cinétiques d'activation des protéines responsables de l'homéostasie calcique. Néanmoins, l'impact des ROS sur les pulsars calciques demeure inexploré. Nous avons établi avec l'article 1 que CaMKII endothéliale est sensible aux pulsars calciques et qu'une activation de cette enzyme par les pulsars engendre une stimulation de la production de NO. De plus, dans un modèle d'hypertension induite par la PE, la relation entre CaMKII et les pulsars calciques est altérée. Toutefois, il est intéressant de noter que le modèle d'hypertension choisi pour l'article 1 écarte l'implication des ROS dans le développement de cette pathologie. Ainsi, il était possible de distinguer l'impact de la pathologie de l'hypertension sur les pulsars et par conséquent, l'impact sur CaMKII endothéliale. Sachant que les ROS font partie intégrante de la pathologie, il est essentiel d'évaluer leur implication dans la modulation des pulsars calciques et l'impact sur la relation avec CaMKII.

## Hypothèses et objectifs de l'article 2

L'hypothèse principale de cette étude est que les ROS modulent les pulsars calciques localisés dans les PMEs, ce qui active spécifiquement CaMKII au niveau de l'endothélium d'artères natives de souris. Nous proposons que cette relation est altérée dans un modèle d'hypertension artérielle induite par l'AngII.

Ainsi, l'objectif principal est d'établir une corrélation entre une stimulation des ROS par l'AngII et les pulsars calciques et par conséquent, déterminer l'impact sur l'activation et la distribution de CaMKII dans l'endothélium d'artères mésentériques.

**Les objectifs spécifiques sont :**

1. Évaluer l'impact d'une stimulation à l'AngII, à différentes concentrations, sur la production de ROS et sur la cinétique des pulsars calciques.
2. Évaluer le rôle des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> sur la stimulation des pulsars calciques.
3. Évaluer l'implication de CaMKII dans la production de NO suite à une stimulation à l'AngII à différentes concentrations.
4. Établir l'impact de l'AngII à différentes concentrations sur l'activation et la localisation de CaMKII.
5. Établir deux modèles d'infusion chronique à l'AngII, soit normotensif et hypertensif chez la souris.
6. Identifier l'impact d'une infusion chronique d'AngII sur les pulsars calciques et l'activation/distribution de CaMKII endothéliale.

## **Manuscript**

### **NEW INSIGHTS ON ENDOTHELIAL $\text{Ca}^{2+}$ MICRODOMAINS AND CAMKII IN ANGIOTENSIN II-INDUCED HYPERTENSION**

Charbel Chimène<sup>1,2</sup>, Toussaint Fanny<sup>1,3</sup>, Gillis Marc-Antoine<sup>1</sup>, M.Sc., Blanchette Alexandre<sup>1</sup>, M.Sc., Comtois Philippe<sup>1,3,5</sup>, Ph.D., Ledoux Jonathan<sup>\*1-4</sup>, Ph.D..

#### **Affiliations:**

<sup>1</sup> Research Center, Montreal Heart Institute, Quebec, Canada

<sup>2</sup> Departments of Pharmacology, <sup>3</sup>Molecular and Integrative Physiology, <sup>4</sup>Medicine and

<sup>5</sup> Institute of biomedical engineering, Université de Montréal, Quebec, Canada

**Short title:** AngII-induced dysfunctional endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  and CaMKII

**Word count of manuscript:** 4367 (5613 with figures)

**Word count of abstract:** 217 words

**Number of figures:** 5 figures (and 3 supplementary figures)

**\*Corresponding author:**

Jonathan Ledoux, Ph.D.

## ABSTRACT

Intracellular calcium signaling is crucial to endothelial control of vascular tone and blood pressure. Recent characterization of endothelial local calcium signals, including calcium pulsars and TRP-sparklets established their role in smooth muscle tone regulation through activation of ion channels, nitric oxide synthase and CaMKII. Hypertension associated with a dysregulation of endothelial calcium homeostasis including calcium microdomains. AngII stimulates deleterious oxidative stress that could impair endothelial calcium, leading to endothelial dysfunction and hypertension. Confocal imaging was used to assess the impact of AngII-induced oxidative stress and hypertension on endothelial calcium pulsars and CaMKII signaling pathway. Both superoxide production and calcium pulsars were enhanced by acute exposure to AngII. Although calcium pulsars were not involved in superoxide increase, AngII-induced superoxide did stimulate calcium pulsars. AT<sub>2</sub> receptors were important to AngII-dependent stimulation of calcium pulsars at a lower dose whilst higher doses of AngII required AT<sub>1</sub> receptors. AngII-stimulation of calcium pulsars was associated with an increase in nitric oxide production, potentiated by CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  translocation to myoendothelial projections. Mouse models of AngII infusion showed that chronic superoxide production is sufficient to alter endothelial calcium pulsars and increase CaMKII translocation to myoendothelial projections. This study unravels the complex interactions between the calcium pulsars-CaMKII-nitric oxide and the AngII-superoxide pathways and how chronic AngII-evoked superoxide production and hypertension alter the pulsar-CaMKII pathway.

**Keywords:** Endothelium – Calcium – CaMKII – Angiotensin II – Hypertension – Oxidative stress

## INTRODUCTION

Endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis is essential for cellular functions including regulation of vascular tone as evidenced by its alteration in endothelial dysfunction associated with arterial hypertension (AH). Involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  as a second messenger in blood pressure control is multifaceted. Notably,  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin complex binding to the endothelial nitric oxide synthase (NOS3) is required to produce nitric oxide (NO), a potent endogenous vasodilator<sup>1</sup>. Endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis has then been the core of numerous investigations on hypertension and endothelial dysfunction.

We recently demonstrated that high blood pressure is associated with an alteration of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars, a localized endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  event<sup>2</sup>. Confined within myoendothelial projections (MEP), pulsars have the capacity to finely modulate endothelial function such as vascular tone through smooth muscle cells (SMCs) hyperpolarization<sup>3</sup> and NO production<sup>2</sup>. Hence,  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars stimulate NO production partially through activation of  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms of calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII). CaMKII has also been reported to control endothelial function through modulation of NOS3 expression<sup>4</sup>. Recent evidence suggests a role for CaMKII in cardiovascular diseases such as heart failure or diabetes-associated hypertension<sup>5-7</sup>. Therefore, characterization of this novel  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar-CaMKII signalling pathway in pathophysiological conditions is necessary to our understanding of endothelial dysfunction associated with hypertension.

Altered endothelial function has been detailed in different vascular pathologies, including hypertension<sup>8, 9</sup>. Angiotensin II (AngII), a hormone physiologically involved in blood pressure control, may have deleterious influence leading to arterial hypertension. The associated endothelial dysfunction is characterized by the alteration of the delicate balance between reactive oxygen species (ROS) and NO<sup>10, 11</sup>. Both AngII receptor subtypes, AT<sub>1</sub>R and AT<sub>2</sub>R, evoke endothelial response and recent studies show the contrasting action of each receptor subtypes on endothelial function, for instance, on ROS and NO production. Superoxide anion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) is one of the most important ROS involved in endothelial dysfunction, especially through the inactivation of NO<sup>12</sup>. However, the relationship between ROS and  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars still remains to be determined.

We therefore hypothesized that intracellular ROS levels can acutely modulate  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars and promote activation of endothelial CaMKII. This relationship was further studied in a pathophysiological context where hypertension and endothelial dysfunction are associated with enhanced ROS production. Chronic AngII administration was then used to generate models with elevated ROS in normotensive (AngII-NT) and hypertensive (AngII-AH) mice. This investigation will improve our understanding of the interactions between CaMKII, local  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and the ROS/NO pathways and might lead to the identification of novel therapeutic target for the treatment of hypertension.

## **METHODS** (Detailed Methods in supplemental information)

All animal studies were done using male C57BL/6 mice (3-4 months old) and procedures were concordant with the Canadian Council on Animal Care guidelines and approved by the Montreal Heart Institute Animal Deontology Committee. 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> order (diameters  $\approx$  60-100  $\mu$ m) mesenteric arteries (MA) were carefully cleaned of connective and adipose tissue. Model of chronic infusion of angiotensin II or vehicle was carried out with subcutaneous implantation of a mini-osmotic pump (Alzet) for constant release (7 days). Hemodynamic parameters were recorded on the 7<sup>th</sup> day post-surgery. As previously<sup>2</sup>, endothelial dynamics imaging was performed on cut-open MA with Fluo-4, CM-H<sub>2</sub>DCFDA and DAF-FM for Ca<sup>2+</sup>, ROS and NO, respectively. Immunofluorescence experiments were carried out in MA with *en-face* configuration as previously<sup>3</sup>. CaMKII distribution within MEPs, identified as fenestrae in IEL, was quantified using the custom-designed ATIFIsNI algorithm<sup>2</sup>.



## RESULTS

### ***Angiotensin II-induced ROS production is independent from $Ca^{2+}$ stores.***

A dose-response curve of endothelial ROS production to acutely applied AngII was thus first established in freshly isolated mesenteric arteries. CM-H<sub>2</sub>DCFDA-associated fluorescence was monitored in endothelium exposed to AngII (1 nM to 10  $\mu$ M). Although low doses of AngII had no effect on cytoplasmic ROS levels, exposure to AngII 100 nM and 10  $\mu$ M significantly increased ROS production in native endothelium (Fig. 1A). Incubation with the nonspecific antioxidant N-Acetyl-Cysteine (NAC 10  $\mu$ M) prevented AngII-increase in ROS, showing that the increase in endothelial fluorescence resulted from AngII-induced ROS production. Also, AngII stimulation of ROS production appears to be independent from vascular myocytes and intracellular  $Ca^{2+}$  stores. Neither inhibition of gap junctions (Carb 10  $\mu$ M) nor SERCA (CPA 10  $\mu$ M) tempered AngII-associated increase in ROS levels (Fig. 1Ac-e). These data suggest that AngII (doses > 1 nM) acutely stimulates ROS production in native endothelium independently from the underlying smooth muscle or the intracellular  $Ca^{2+}$  stores.

### ***Angiotensin II-induced ROS stimulates $Ca^{2+}$ pulsars.***

Although AngII-induced ROS production is independent from  $Ca^{2+}$  stores, reciprocal influence on  $Ca^{2+}$  pulsars is yet undetermined. AngII significantly increased  $Ca^{2+}$  pulsars frequency in a concentration dependent manner (Fig. 1Bb). Moreover, AngII appears to recruit additional  $Ca^{2+}$  pulsars sites (19 to 34% increase) (Fig. 1Bc). Interestingly, whilst 1 nM AngII had no effect on individual pulsar site frequency, higher doses are associated with increased frequencies (Fig. 1Bd). The antioxidant NAC abolished the AngII-induced increase in  $Ca^{2+}$  pulsars frequency for AngII doses greater than 1 nM (Fig. 1Bb). Furthermore, AT<sub>1</sub> receptor blockade with candesartan (Cand 10  $\mu$ M) blunted AngII-dependent increases in global  $Ca^{2+}$  pulsars frequency and active site population but only at high (100 nM and 10  $\mu$ M) concentrations (Fig. 1Bb-c). On the other hand, AT<sub>2</sub> receptor antagonism with PD123177 (10 nM) significantly limited AngII stimulation of  $Ca^{2+}$  pulsars at all concentrations tested. Interestingly, AngII-induced increase in individual  $Ca^{2+}$  pulsar site frequency was abolished by NAC or both ATR antagonists (Fig. 1Bd).

### ***Angiotensin II stimulates NO production through CaMKII activation.***

We recently showed that  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars stimulates NO production, partly through CaMKII activation<sup>2</sup>. The effect of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars stimulation by AngII on NO production was then sought. AngII significantly increased NO production in a concentration dependent manner (Fig. 2), an effect blunted by pre-incubation with KN-93 (10  $\mu\text{M}$ ), a CaMKII inhibitor. Contribution of CaMKII in the pulsars-induced production of NO implied a translocation of the kinase at the MEP as previously<sup>2</sup>. As reported, only CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  were found in clusters localized within IEL fenestrae and thus MEPs, corresponding to established  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars subcellular location. Moreover, arterial exposure to AngII significantly increased endothelial CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  densities within MEPs independently of AngII concentrations (Fig. 3). However, similar changes in subcellular distribution were not observed for CaMKII $\delta$  (Suppl. Fig. 1).

***Angiotensin II-induced hypertension alters endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis.***

Chronic AngII leading to endothelial dysfunction is associated with elevated ROS levels and concomitant decreased NO bioavailability. However, the impact of chronic AngII on localized  $\text{IP}_3\text{R}$ -dependent signaling remains to be established. The contribution of ROS to chronic AngII-induced alterations in  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars was determined with chronic infusion of AngII *via* osmotic pumps. Two groups were used: a low dose of AngII did not increase blood pressure (AngII-NT), higher concentration of AngII developed a significantly higher ( $\approx 20\%$ ) aortic systolic blood pressure (AngII-AH) (Suppl Fig. 2). However, both groups showed a strong and similar increase in  $\text{O}_2^{\cdot-}$  levels (Fig. 4). Global  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars frequency was increased in both groups compared to control with a significantly greater frequency in endothelium from AngII-AH animals (Fig. 4D). Recruitment of *de novo*  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars sites is also more important in the hypertensive group (Fig. 4E). Individual  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar site frequency is increased in arteries from AngII-NT group however, no changes were found between the two AngII groups (Fig. 4F)

***Endothelial CaMKII subcellular distribution in chronic Angiotensin II-infused mice***

The impact of the increased endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars by chronic AngII on CaMKII was then sought. Figure 5A shows that clustering of autophosphorylated (T286), and thus activated form of CaMKII was increased by chronic AngII infusion with higher densities within IEL

fenestrations of both AngII groups (Fig. 5Ab). Moreover, both endothelial-specific CaMKII isoforms ( $\alpha$  and  $\beta$ ) showed stronger clustering within IEL fenestrae in mice with chronic AngII (Fig. 5B). Unlike CaMKII $\alpha$ , higher densities for CaMKII $\beta$  were detected in arteries from AngII-AH mice compared to AngII-NT (Fig. 5Bi & ii). In accordance with acute AngII data, CaMKII $\delta$  distribution was not affected in AngII-NT arteries (Suppl. Fig. 3).

## DISCUSSION

Recent work provided compelling evidence of the physiological relevance of endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains to vascular function<sup>13-15</sup>. Indeed, several spatially restricted  $\text{Ca}^{2+}$  signals have been characterized with the accompanying characterization of subcellular structure allowing such microdomains<sup>3, 13, 15, 16</sup>. We recently elucidated a novel-signaling pathway in native endothelium where  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains specifically activate a kinase and potentiate  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NO production by NOS3<sup>2</sup>. We also provided the first evidence of an alteration of endothelial IP<sub>3</sub>R-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  signaling,  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars, in pathological condition. Although the hypertension model (chronic phenylephrine infusion) used in that study shows limited oxidative stress, compelling evidence suggest an important contribution of ROS in hypertension associated with excessive AngII levels. The current study was thus undertaken to: 1) establish the impact of AngII on IP<sub>3</sub>R-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains in endothelial cells; 2) determine the role of the  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar - CaMKII pathway in production of NO under AngII stimulation; and 3) elucidate the impact of chronic AngII on  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar – CaMKII pathway.

AngII is critical to physiological preservation of homeostasis. However, loss of control mechanisms lead to increased circulating levels of AngII, elevated ROS production, endothelial dysfunction and high blood pressure<sup>17, 18</sup>. AngII can promote protective influence *via* NO production but can also exert deleterious vascular damage through excessive oxidative stress, including exaggerated generation of superoxide anions ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). In accordance with previous work<sup>17, 19</sup>, this study demonstrates a concentration-dependent increase in endothelial  $\text{O}_2^{\cdot-}$  levels *in situ* in response to acute AngII exposure. Although a lower dose of AngII (1 nM) failed to change  $\text{O}_2^{\cdot-}$  levels, 100 nM and 10  $\mu\text{M}$  AngII dose-dependently increased  $\text{O}_2^{\cdot-}$  in native endothelium, an effect prevented by NAC.

As expected, a concentration-dependent AngII-evoked stimulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics was found. Indeed, AngII was shown to prompt intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  increase through IP<sub>3</sub> production and PKC pathway activation<sup>20</sup>. However, there was so far no direct evidence of AngII modulation of ER store-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains and  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars are the first identified IP<sub>3</sub>R-dependent oscillatory  $\text{Ca}^{2+}$  signal modulated by AngII. The data provided in

this study suggests that a low dose of AngII (1nM) stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars independently of ROS, mainly through recruitment of new sites, but greater AngII concentration increases individual  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar frequency in a ROS-dependent manner. The exact and detailed mechanisms involved in this differential modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars were not explored here. Smooth muscle communication or  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars are not involved in AngII-induced ROS production, since neither inhibition of gap junctions or  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars altered AngII-induced ROS production. This is significant, as  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent activation of NOX5 and ROS production has been reported<sup>21</sup>, which also involves CaMKII<sup>22</sup>. However, in this preparation and experimental conditions, AngII does not appear to require  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars to stimulate generation of ROS.

AngII contribution to vascular homeostasis and pathophysiological development is mediated by two specific receptors, AT<sub>1</sub>R and AT<sub>2</sub>R. AT<sub>1</sub>R, found in both endothelial and smooth muscle cells, is generally considered deleterious. Conversely, AT<sub>2</sub>R is not expressed in myocytes and its activation on endothelial cells is essentially beneficial<sup>23, 24</sup>. Experiments with candesartan, an AT<sub>1</sub>R antagonist, and PD123177, an AT<sub>1</sub>R inhibitor suggest that low levels of AngII stimulates AT<sub>2</sub>R and facilitates  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars occurrence whilst higher concentrations of AngII activated AT<sub>1</sub>R, leading to ROS production. The data herein is very close to the receptors EC<sub>50</sub> (8 nM and 0.5 nM for AT<sub>1</sub>R and AT<sub>2</sub>R, respectively)<sup>25, 26</sup> with the AngII effects mostly through AT<sub>2</sub>R at 1 nM but mainly through AT<sub>1</sub>R at higher concentrations.

In addition to its modulation of ROS levels, AngII also regulates NO production, highlighting the crucial role of the enzyme in the control of vascular function through the balance of ROS/NO levels. The stimulation of NO production by AngII has been reported in cultured endothelial cells<sup>27</sup>. Here, a dose-dependent stimulation of NO production by AngII was found. Translocation of CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  to the MEPs and a significant reduction in NO production in the presence of KN-93 suggest CaMKII activation by AngII. The proposed pathway would be through AT<sub>2</sub>R (at low doses), activating  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars, which effect would be twofold: 1) activate NOS3 within MEPs; and 2) promote CaMKII translocation within MEPs to sensitize NOS3 to  $\text{Ca}^{2+}$  and potentiate NO production. Higher levels of AngII would

involve AT<sub>1</sub>R and ROS production. Noteworthy, this is the first report of the involvement of endothelial Ca<sup>2+</sup> microdomains and CaMKII-NOS3 pathway in response to AngII stimulation.

High intracellular levels of ROS, hallmark of AngII-associated hypertension is deleterious by inducing endothelial dysfunction. To circumspect the role of AngII-induced ROS production within AngII-induced hypertension, chronic infusion of two different concentrations of AngII were used. Although chronic infusion of both AngII concentrations similarly increased ROS levels, only the highest dose (AngII-AH) raised blood pressure, thereby validating the use of these models to investigate chronic AngII-dependent ROS. Our results suggest that hypertension is associated with increased Ca<sup>2+</sup> pulsars, in accordance with our previous work<sup>2</sup>. Moreover, chronically enhanced ROS production appears as a modulator of individual Ca<sup>2+</sup> pulsars frequency independently of blood pressure.

Altered Ca<sup>2+</sup> pulsars dynamics in AngII-infused mice is also translated in endothelial CaMKII activation and translocation to MEPs as evidenced by increased CaMKII (T286) and both endothelial CaMKII isoforms density within IEL fenestrations. Translocation of CaMKII did not require high global Ca<sup>2+</sup> pulsar frequency but is rather sensitive to the population of active pulsar sites, since 1 nM AngII was found to recruit *de novo* active sites. This is also supported by the monitoring of endothelial NO, where a CaMKII-dependent portion of NO increase was found at all AngII concentrations. However, the dose-dependent increase in NO production cannot be explained by the sole subcellular redistribution of CaMKII because translocation of both isoforms was maximal at 1 nM. CaMKII has several levels of activation that are dependent on amplitude and frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations<sup>28</sup>. Higher Ca<sup>2+</sup> pulsar frequency could then activate CaMKII to higher activation levels and leading to the observed dose-dependent NO production by CaMKII.

Sonkusare *et al.* recently reported a disrupted localized endothelial Ca<sup>2+</sup> signaling in AngII-induced hypertension<sup>14</sup>. They demonstrated a decrease in endothelial TRPV4-sparklets from hypertensive animals due to loss of signaling microdomains. Ca<sup>2+</sup> pulsars and TRPV4-sparklets are distinct Ca<sup>2+</sup> signals and are likely subject to different regulatory mechanisms. A cerebral-specific endothelial Ca<sup>2+</sup> signaling, TRPA1-sparklet is stimulated by ROS<sup>15</sup>. Indeed, Sullivan *et al.* elegantly showed that ROS production by NOX2 activates TRPA1 via lipid

peroxidation, triggering  $\text{Ca}^{2+}$ -sparklets and vasodilation. Although TRPA1 is not expressed in endothelium from mesenteric arteries, similar contribution of a yet unidentified  $\text{Ca}^{2+}$  influx ( $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release) would require further investigation.

### **Perspectives**

This study elucidates a novel signaling pathway where AngII leads to an increased NO production in ECs. Indeed, AngII stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars frequency in a concentration and ROS dependent-manner causes an increase in CaMKII clustering within MEP stimulating NO production. Moreover,  $\text{AT}_2\text{R}$  convey effect of low AngII doses. These findings improve the current understanding of AngII modulation of endothelial function and shed light on novel intracellular signaling pathways involved in AngII-induced alteration of vascular homeostasis.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are thankful to D. Béziau for critical review of the manuscript and L.R. Villeneuve for assistance in confocal microscopy.

## **SOURCES OF FUNDING**

This work was supported by Université de Montreal (C.C., F.T.), MHI (C.C., F.T.), SQHA (F.T.), NSERC (P.C.) FRQS (F.T., J.L., P.C.), CIHR, CFI and HSFC (J.L.).

## **DISCLOSURE**

None



## LEGENDS

**Fig. 1** Endothelial reactive oxygen species production and  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars by application of angiotensin II in mesenteric arteries.

**Aa** Typical images of reactive oxygen species (ROS) levels monitored in CM- $\text{H}_2\text{DCFDA}$ -loaded endothelial cells with acute exposure to AngII. Bar 10  $\mu\text{m}$ . **Ab** Time-course of CM- $\text{H}_2\text{DCFDA}$ -associated fluorescence ( $F/F_0$ ) from endothelium exposed to cumulative doses of AngII. **Ac-f** Bar graph summarizing ROS production prior (control, white) and after application of cumulative AngII concentrations (1 nM, green; 100 nM, blue; 10  $\mu\text{M}$ , red,  $n=8$ ) in the absence (C) or presence of: (D) a nonspecific antioxidant N-Acetyl-Cysteine (NAC 10  $\mu\text{M}$ ,  $n=8$ ); (E) the gap junction inhibitor carbenoxolone (Carb; 10  $\mu\text{M}$ ,  $n=7$ ); or (F) a SERCA pump inhibitor cyclopiazonic acid (CPA 10  $\mu\text{M}$ ,  $n=6$ ). ANOVA: \* vs. Ctrl;  $p<0.0001$ . **Ba** Typical field of view from a Fluo-4-loaded endothelium. Regions of interest (ROIs), identified with crosses, were manually positioned at the point of highest amplitude of the  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar (Ctrl, yellow; AngII, yellow and pink). Bar: 10  $\mu\text{m}$ . **Bb-d** Graphs summarizing experiments as in A following acute exposure to AngII (0.001  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ; circles) in the absence or presence of: N-Acetyl-Cysteine (NAC 10  $\mu\text{M}$ ; squares), candesartan (Cand 10  $\mu\text{M}$ ; filled triangles) or PD123177 (PD123177 10 nM, empty triangles), respectively. t-test: \* vs. Ctrl (dashed line), † vs. 0.001  $\mu\text{M}$ , ‡ vs. 0.1  $\mu\text{M}$  and § vs. 10  $\mu\text{M}$ ,  $p<0.05$ ,  $n\geq 3$

**Fig. 2** Stimulation of nitric oxide production in endothelial cells after acute exposure to angiotensin II from resistance arteries.

**A-C** Representative images of nitric oxide (NO) production recorded with a NO-specific fluorescent dye (DAF-FM) in preferentially loaded in ECs (a) prior and (b) following application of AngII, in the absence or presence of KN-93 (c,d, 10  $\mu\text{M}$ ; 10 min). Bar: 10  $\mu\text{m}$ . **D** Bar graph illustrating NO production in ECs after exposure to AngII (1 nM, green; 100 nM, blue; 10  $\mu\text{M}$ , red) with and without KN-93 pre-incubation. t-test: \* vs. Ctrl, † vs. 0.001  $\mu\text{M}$ ,  $p<0.01$ ,  $n\geq 3$

**Fig. 3** Endothelial CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  subcellular distribution in the presence of angiotensin II in resistance arteries.

Immunostaining for (A) CaMKII $\alpha$  or (B)  $\beta$  (red) in ECs with the IEL (green) in (i) the absence and (ii-iv) presence of AngII. Bar: 10  $\mu$ m.  $n \geq 3$ . Arrows indicate (A) CaMKII $\alpha$  or (B) CaMKII $\beta$  fluorescence densities localized within IEL fenestrations. (v) Cropped image of a three-dimensional view showing fluorescence densities of (A) CaMKII $\alpha$  or (B) CaMKII $\beta$  throughout ECs and projecting through the depth of an IEL fenestrae in the presence of 10  $\mu$ M AngII. Bar: 2  $\mu$ m.

**Fig. 4** Endothelial superoxide and Ca<sup>2+</sup> pulsars stimulation in angiotensin II-induced hypertensive mice.

**A** Typical example of dihydroethidium (DHE; 5  $\mu$ M) staining in endothelial cells from Sham (Sham), AngII-NT and AngII-induced hypertensive (AngII-AH) mice. Bar: 10  $\mu$ m. **B** Bar graph of DHE fluorescence in Sham (white), AngII-NT (gray) and AngII-AH (black) mice. ANOVA, \* vs. Sham,  $p = 0.0002$ ,  $n = 7$ . **C** Typical field of view from a Fluo-4-loaded endothelium of an AngII-AH mouse. Regions of interest (ROIs), identified with boxes were used to analyze Ca<sup>2+</sup> pulsars. Bar: 10  $\mu$ m. **D-F** Bar graphs summarizing data from experiments as in B, in Sham, AngII-NT and AngII-AH mice. ANOVA: \* vs. NT, † vs. AngII-NT,  $p < 0.001$ ,  $n = 7$ .

**Fig. 5** Endothelial distribution of activated CaMKII (T286), CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  in resistance arteries from angiotensin II-infused mice.

Immunostaining of (A) CaMKII (T286), (Ba) CaMKII $\alpha$  or (Bb)  $\beta$  (red) in ECs and within the IEL (green) fenestrations from (i) control (Sham), (ii) AngII-NT and (iii) AngII-induced hypertensive (AngII-AH) mice. Arrows indicate (A) T286, (Ba) CaMKII $\alpha$  and (Bb) CaMKII $\beta$  fluorescence densities localized within IEL fenestrae. Bar: 10  $\mu$ m.  $n \geq 3$ . Cropped image of a three-dimensional view showing fluorescence densities of (Ab) T286, (Baiii) CaMKII $\alpha$  or (Bbiii) CaMKII $\beta$  throughout ECs and projecting through the depth of the IEL in a mesenteric artery from an AngII-AH mouse. Bar: 2  $\mu$ m. **Ac** Bar graph reporting CaMKII T286 densities

analysis within IEL fenestrations from Sham (white, n= 10), AngII-NT (gray, n= 9) and AngII-AH (black, n= 12) mice. ANOVA: \* vs. Sham, p= 0.0001. Baiv & Bbiv Bar graphs reporting CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  densities analysis within IEL fenestrations from Sham (white, n= 7 and n= 10, respectively), AngII-NT (gray, n= 8 and n= 8, respectively) and AngII-AH (black, n= 9 and n= 9, respectively) mice. ANOVA: \* vs. Sham, † vs. AngII-NT, p $\leq$  0.0002.

## REFERENCES

1. Fleming, I., Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Kemp, B.E. & Busse, R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 2001; **88**: E68-75.
2. Charbel, C., Toussaint, F., Béziau, D., *et al.* Functional activation of endothelial CaMKII by Ca<sup>2+</sup> microdomains. *Science Advances*, 2015; **SUBMITTED**.
3. Ledoux, J., Taylor, M.S., Bonev, A.D. *et al.* Functional architecture of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in restricted spaces of myoendothelial projections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 9627-9632.
4. Cai, H., Davis, M.E., Drummond, G.R. & Harrison, D.G. Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II/janus kinase 2-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21**: 1571-1576.
5. Couchonnal, L.F. & Anderson, M.E. The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease. *Physiology (Bethesda)* 2008; **23**: 151-159.
6. Yousif, M.H., Akhtar, S., Walther, T. & Benter, I.F. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in development of vascular dysfunction in diabetic rats with hypertension. *Cell Biochem Funct* 2008; **26**: 256-263.
7. Yousif, M.H., Benter, I.F. & Akhtar, S. Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II normalizes diabetes-induced abnormal vascular reactivity in the rat perfused mesenteric vascular bed. *Auton Autacoid Pharmacol* 2003; **23**: 27-33.
8. Hadi, H.A., Carr, C.S. & Al Suwaidi, J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag* 2005; **1**: 183-198.
9. Widlansky, M.E., Gokce, N., Keaney, J.F., Jr. & Vita, J.A. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; **42**: 1149-1160.
10. Panza, J.A., Quyyumi, A.A., Brush, J.E., Jr. & Epstein, S.E. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990; **323**: 22-27.
11. Cardillo, C., Kilcoyne, C.M., Quyyumi, A.A., Cannon, R.O., 3rd & Panza, J.A. Selective defect in nitric oxide synthesis may explain the impaired endothelium-

- dependent vasodilation in patients with essential hypertension. *Circulation* 1998; **97**: 851-856.
12. Zalba, G., San Jose, G., Moreno, M.U. *et al.* Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 2001; **38**: 1395-1399.
  13. Sonkusare, S.K., Bonev, A.D., Ledoux, J. *et al.* Elementary Ca<sup>2+</sup> signals through endothelial TRPV4 channels regulate vascular function. *Science* 2012; **336**: 597-601.
  14. Sonkusare, S.K., Dalsgaard, T., Bonev, A.D. *et al.* AKAP150-dependent cooperative TRPV4 channel gating is central to endothelium-dependent vasodilation and is disrupted in hypertension. *Sci Signal* 2014; **7**: ra66.
  15. Sullivan, M.N., Gonzales, A.L., Pires, P.W. *et al.* Localized TRPA1 channel Ca<sup>2+</sup> signals stimulated by reactive oxygen species promote cerebral artery dilation. *Sci Signal* 2015; **8**: ra2.
  16. Tran, C.H., Taylor, M.S., Plane, F. *et al.* Endothelial Ca<sup>2+</sup> wavelets and the induction of myoendothelial feedback. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012; **302**: C1226-1242.
  17. Laursen, J.B., Rajagopalan, S., Galis, Z., Tarpey, M., Freeman, B.A. & Harrison, D.G. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 1997; **95**: 588-593.
  18. Viridis, A., Neves, M.F., Amiri, F., Touyz, R.M. & Schiffrin, E.L. Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice. *J Hypertens* 2004; **22**: 535-542.
  19. Touyz, R.M. & Schiffrin, E.L. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens* 2001; **19**: 1245-1254.
  20. Kondo, T., Konishi, F., Inui, H. & Inagami, T. Diacylglycerol formation from phosphatidylcholine in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **187**: 1460-1465.
  21. Montezano, A.C., Burger, D., Paravicini, T.M. *et al.* Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced oxidase 5 (Nox5) regulation by angiotensin II and endothelin-1 is mediated via calcium/calmodulin-dependent, rac-1-independent pathways in human endothelial cells. *Circ Res* 2010; **106**: 1363-1373.

22. Pandey, D., Gratton, J.P., Rafikov, R., Black, S.M. & Fulton, D.J. Calcium/calmodulin-dependent kinase II mediates the phosphorylation and activation of NADPH oxidase 5. *Mol Pharmacol* 2011; **80**: 407-415.
23. Munzenmaier, D.H. & Greene, A.S. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension* 1996; **27**: 760-765.
24. Barber, M.N., Sampey, D.B. & Widdop, R.E. AT(2) receptor stimulation enhances antihypertensive effect of AT(1) receptor antagonist in hypertensive rats. *Hypertension* 1999; **34**: 1112-1116.
25. Bosnyak, S., Jones, E.S., Christopoulos, A., Aguilar, M.I., Thomas, W.G. & Widdop, R.E. Relative affinity of angiotensin peptides and novel ligands at AT1 and AT2 receptors. *Clin Sci (Lond)* 2011; **121**: 297-303.
26. Miura, S. & Karnik, S.S. Angiotensin II type 1 and type 2 receptors bind angiotensin II through different types of epitope recognition. *J Hypertens* 1999; **17**: 397-404.
27. Millatt, L.J., Abdel-Rahman, E.M. & Siragy, H.M. Angiotensin II and nitric oxide: a question of balance. *Regul Pept* 1999; **81**: 1-10.
28. De Koninck, P. & Schulman, H. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Science* 1998; **279**: 227-230.

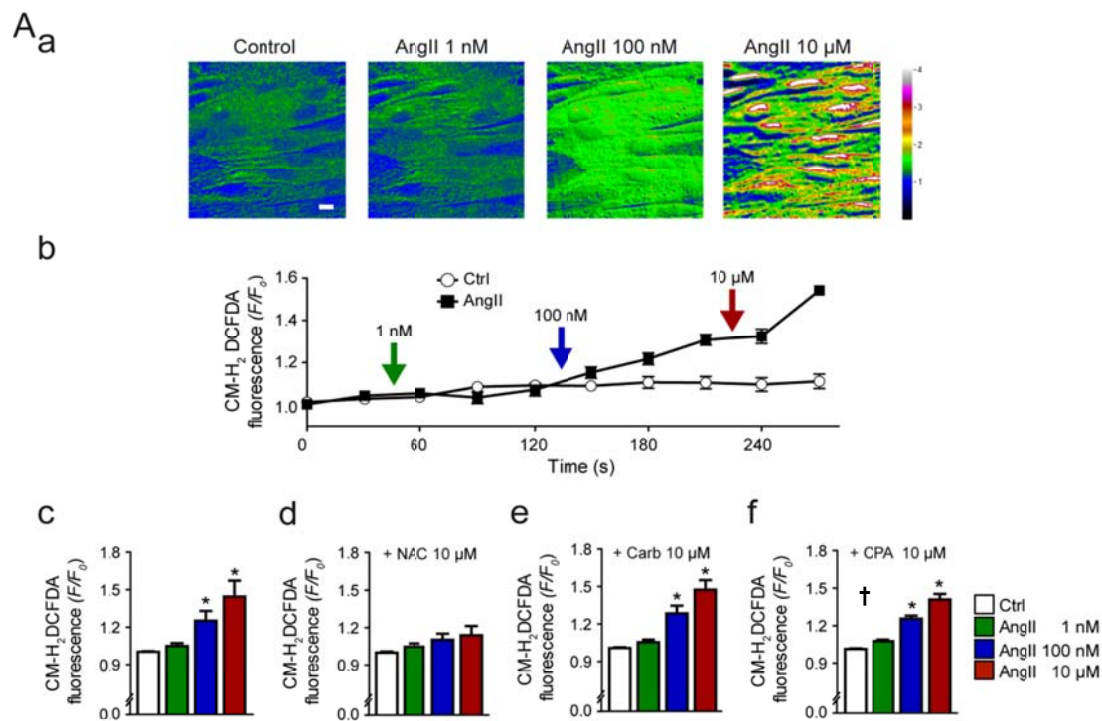


Figure 1

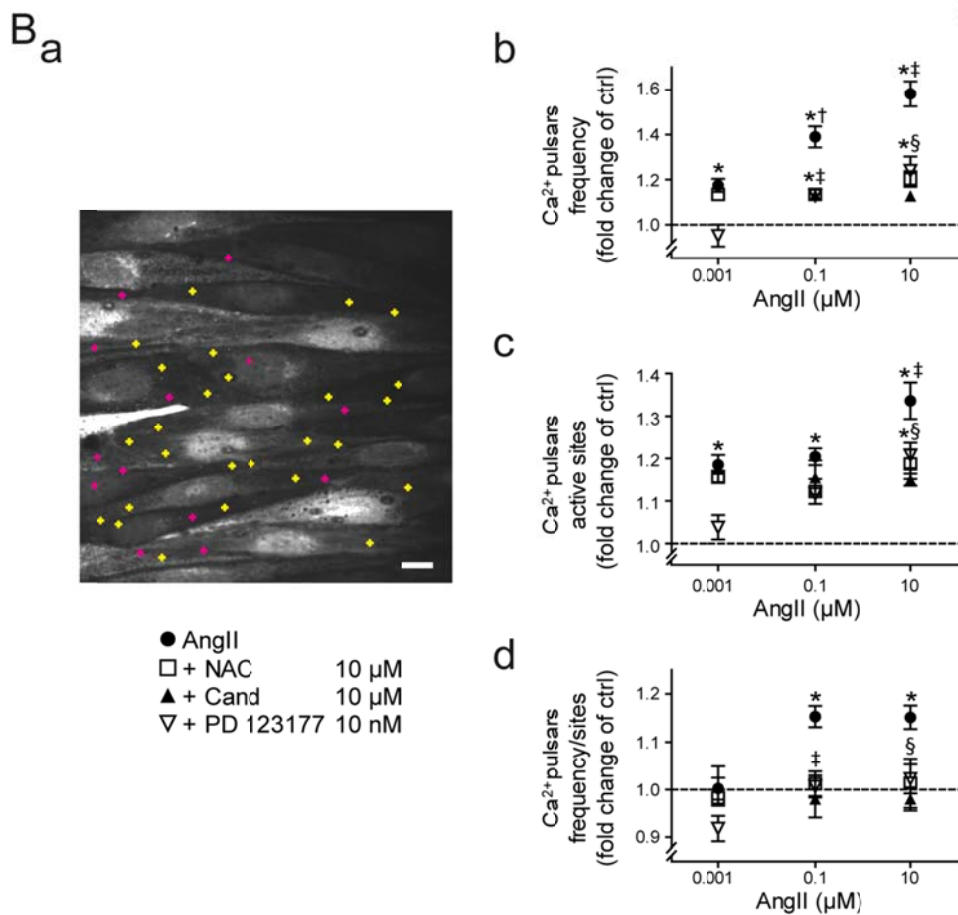


Figure 2

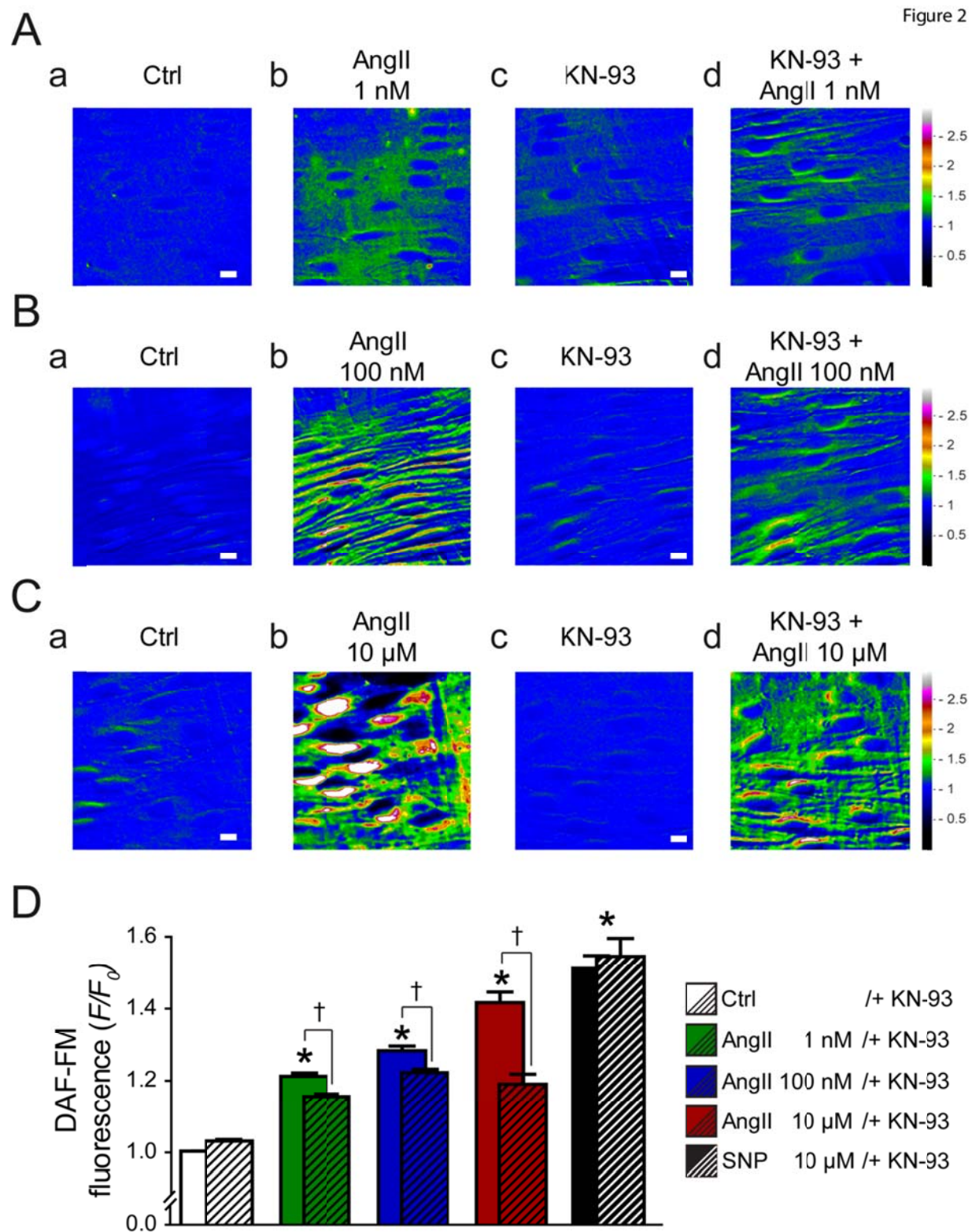
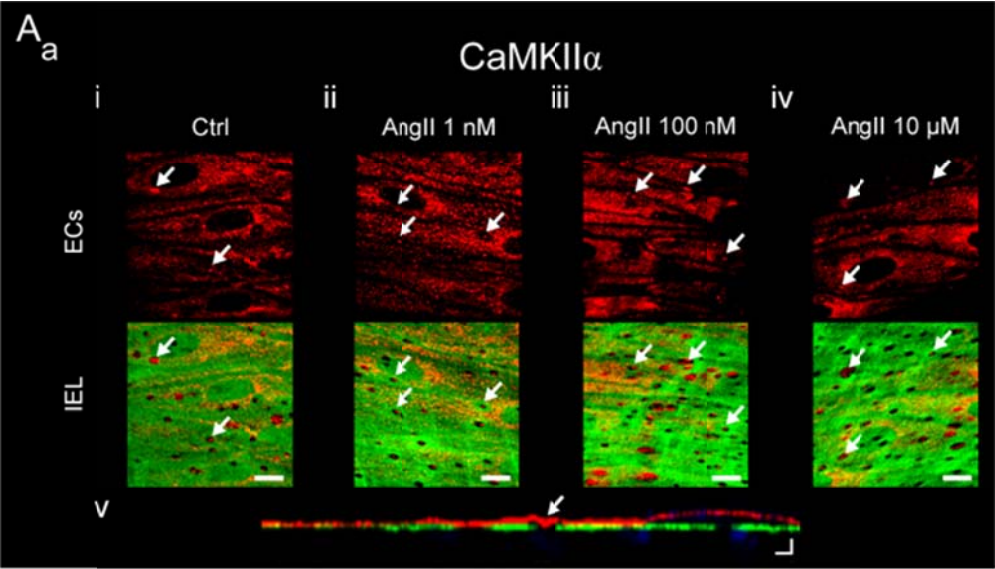
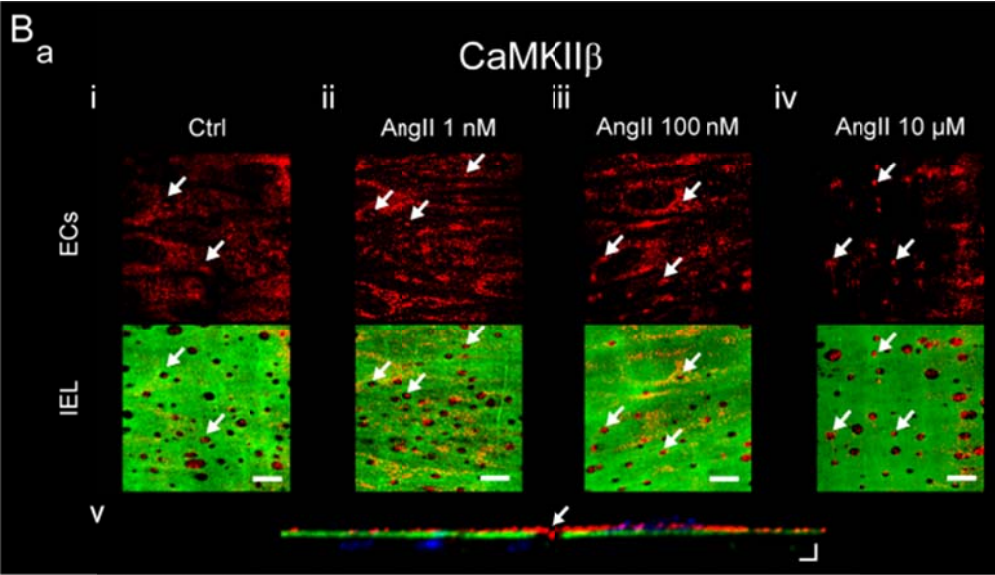
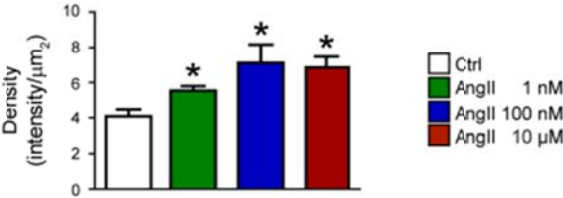




Figure 3



**b**



**b**

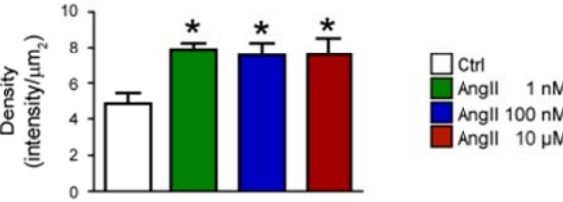


Figure 4

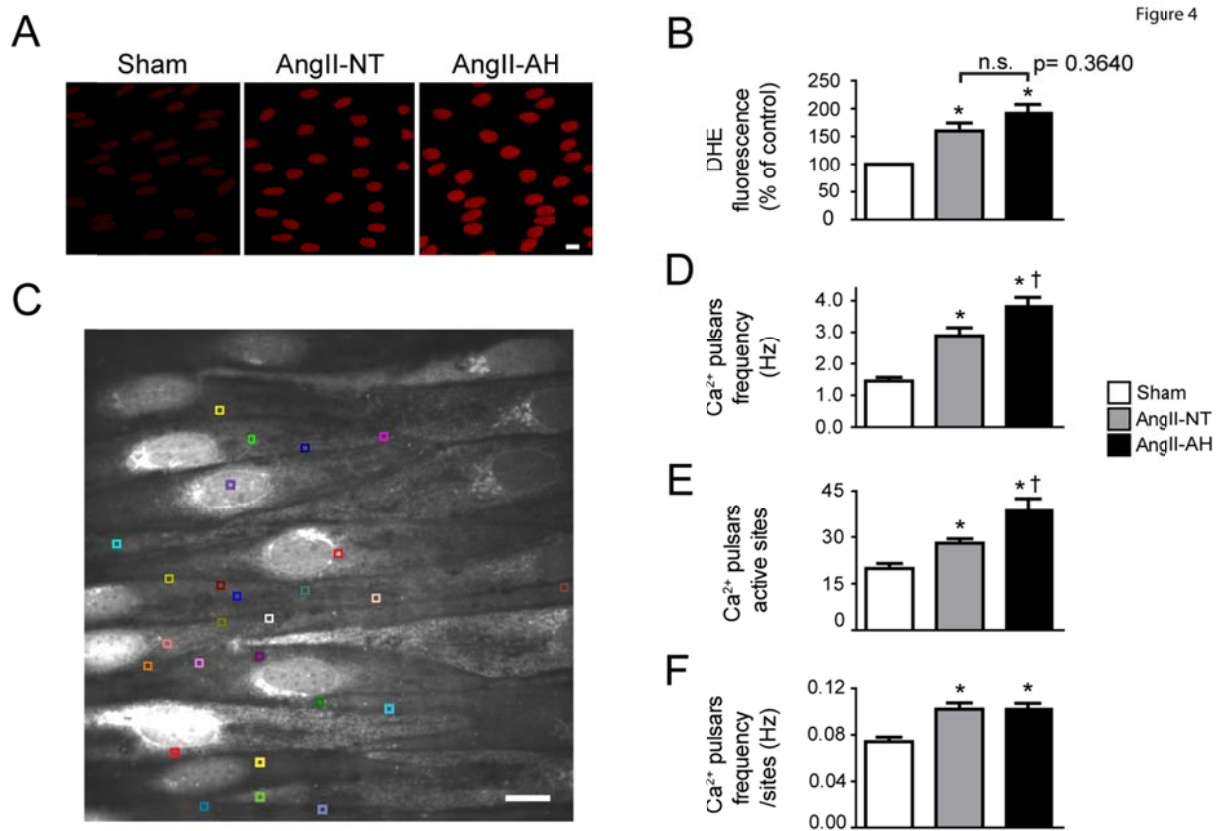
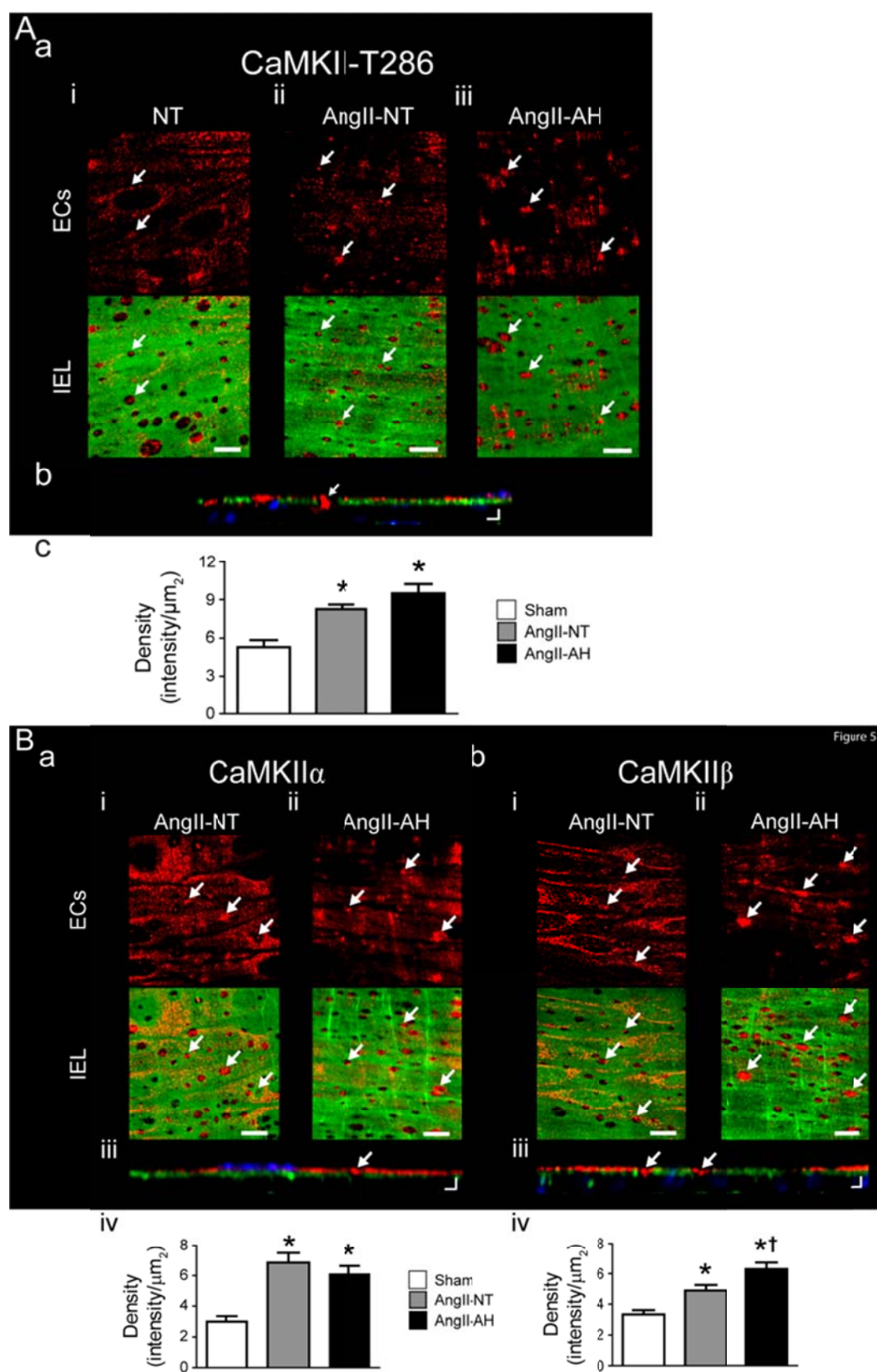


Figure 5



## SUPPLEMENTAL MATERIAL & METHODS

### *Chronic AngII infusion model*

All animal studies were made using male C57BL/6 mice (3-4 months old) and carried out through procedures approved by the Research Center of the Montreal Heart Institute Animal Deontology Committee. Mini-osmotic pump were used for constant subcutaneous delivery of AngII or vehicle for 7 days. Different doses of AngII were used to achieve arterial hypertension (AngII-AH; 2.74 mg/Kg/day) or its AngII-infused normotensive counterpart (AngII-NT; 200 ng/Kg/min). Control normotensive (Sham) mice were implanted with a pump containing only the vehicle (saline 0.9% NaCl). Blood pressure and hemodynamics parameters were acquired on anesthetized mouse (2% isoflurane) 7 days post-surgery from the right carotid and the left ventricle using a Millar catheter 1.4F spr839 (Millar instrument). Data was collected and analyzed using the IOX v2.8.1.8 software (EMKA technologies). AngII-AH mice had an aortic systolic pressure of  $121 \pm 1$  mm Hg compared to AngII-NT with  $102 \pm 1$  mm Hg or Sham with  $98 \pm 2$  mm Hg (Suppl. Fig.1).

### *Endothelial ROS, $Ca^{2+}$ and NO high-speed confocal imaging*

High speed monitoring of fluorescence in cut-open mesenteric arteries was carried out as previously[678] using an Andor Revolution confocal system (Andor Technology). Briefly, images were acquired at  $\approx 15$  frames/sec (ex/em 488/510) using Andor iQ 2.8 software (Andor Technology) with an iXon EMCCD camera on an upright Nikon microscope and a 60X, water-dipping objective (NA 1.0). All experiments were performed at 37°C in a physiological salt solution (PSS; 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 11 mM Glucose and 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>). Fluo-4 (10  $\mu$ M, 45 min at 37°C), H<sub>2</sub>DCFDA (20  $\mu$ M, 30 min at 37°C) and DAF-FM (20  $\mu$ M; 30 minutes at 37°C), were used to record endothelial dynamic  $Ca^{2+}$ , ROS and NO intracellular levels, respectively following exposure to AngII (0.001, 0.1 and 10  $\mu$ M).  $Ca^{2+}$  pulsars stimulation was studied in presence of an antioxidant, N-Acetyl-Cystein (NAC 10  $\mu$ M) and AngII receptors antagonist, AT<sub>1</sub>R (candesartan 10  $\mu$ M) and AT<sub>2</sub>R (PD123177 10 nM). ROS associated fluorescence was recorded as well in the presence of NAC, but also of a gap junction inhibitor, carbenoxolone (Carb 10  $\mu$ M) or a SERCA pumps inhibitor, cyclopiazonic acid (CPA 10  $\mu$ M). KN-93 (10

$\mu\text{M}$ ; 10 minutes) was used to inhibit CaMKII activation. Sodium nitroprusside (SNP 10  $\mu\text{M}$ ), a NO donor, was used as control in NO-associated fluorescence.

### ***Immunohistochemistry***

Freshly harvested and cleaned MA, pinned in *en-face* configuration were perfused in HEPES solution (134 mM NaCl, 6 mM KCl, 10 mM glucose, 10 mM Hepes, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4) prior incubation, when specified, with AngII (0.001, 0.1 and 10  $\mu\text{M}$ , 15 minutes) and then fixed with 4% paraformaldehyde (20 minutes). Tissue were then permeabilized (0.2% Triton X-100) and blocked (4% normal donkey serum) before an overnight incubation at 4°C with specific primary antibodies for each CaMKII isoforms (CaMKII $\alpha$  Abcam Cat. No. ab50202; CaMKII $\beta$  Abcam Cat. No. ab22131; CaMKII $\delta$  Proteintech Cat. No. 20667-1-AP; CaMKII $\gamma$  Santa Cruz Cat. No. sc-1541) and the phosphorylated form (CaMKII T286 Badrilla, Cat. No. A010-50). Arteries were subsequently incubated 1h with donkey anti-rabbit Alexafluor 647 secondary antibody (Invitrogen, ex/em: 647/670 nm) and mounted on a FluoroDish with 4% Dabco (1/10 glycerol). Internal elastic lamina (IEL) autofluorescence was assessed at ex/em 488/520 nm, where nuclear staining with DAPI at 405/460 nm. Acquisition of z-stacks images (0.25 mm increments) was made using a Zeiss LSM 510 system confocal microscope (63X oil objective, numerical aperture of 1.4). Images were then deconvolved using the Maximum Likelihood estimation algorithm and the appropriate experimentally determined Point Spread Function (PSF) with Huygens Professional software 3.6 (Scientific Volume Imaging, Netherlands). 3D stacks of CaMKII distribution within myoendothelial projections (MEP), identified as holes in the internal elastic lamina (IEL), were used to quantify CaMKII distribution using the custom-designed ATIFIsNI algorithm[678], created in Matlab v7.0.1 (The Mathworks inc., MA).

### ***Superoxide anion detection***

Superoxide anions ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) were detected in endothelium from cut-opened arteries using dihydroethidium (DHE). Arteries from mice with osmotic pumps were incubated 15 minutes at room temperature with DHE (5  $\mu\text{M}$ ) and DAPI, for nuclear staining. Although DHE fluorescence was acquired similarly to immunohistochemistry described above, analysis was performed with Image J.

***Statistical analysis.***

Every experimental condition was evaluated within a sample of 3 to 5 arteries harvested from a minimum of 2 mice. Data is presented as mean  $\pm$  SEM. Appropriate statistical analysis using corresponding unpaired t-test or ANOVA followed by Bonferroni post-test with GraphPad Prism 5 software. Values were considered significantly different at  $p < 0.05$ .

## SUPPLEMENTAL LEGENDS

**Suppl. Fig. 1** Intracellular distribution of endothelial CaMKII $\delta$  in resistance arteries.

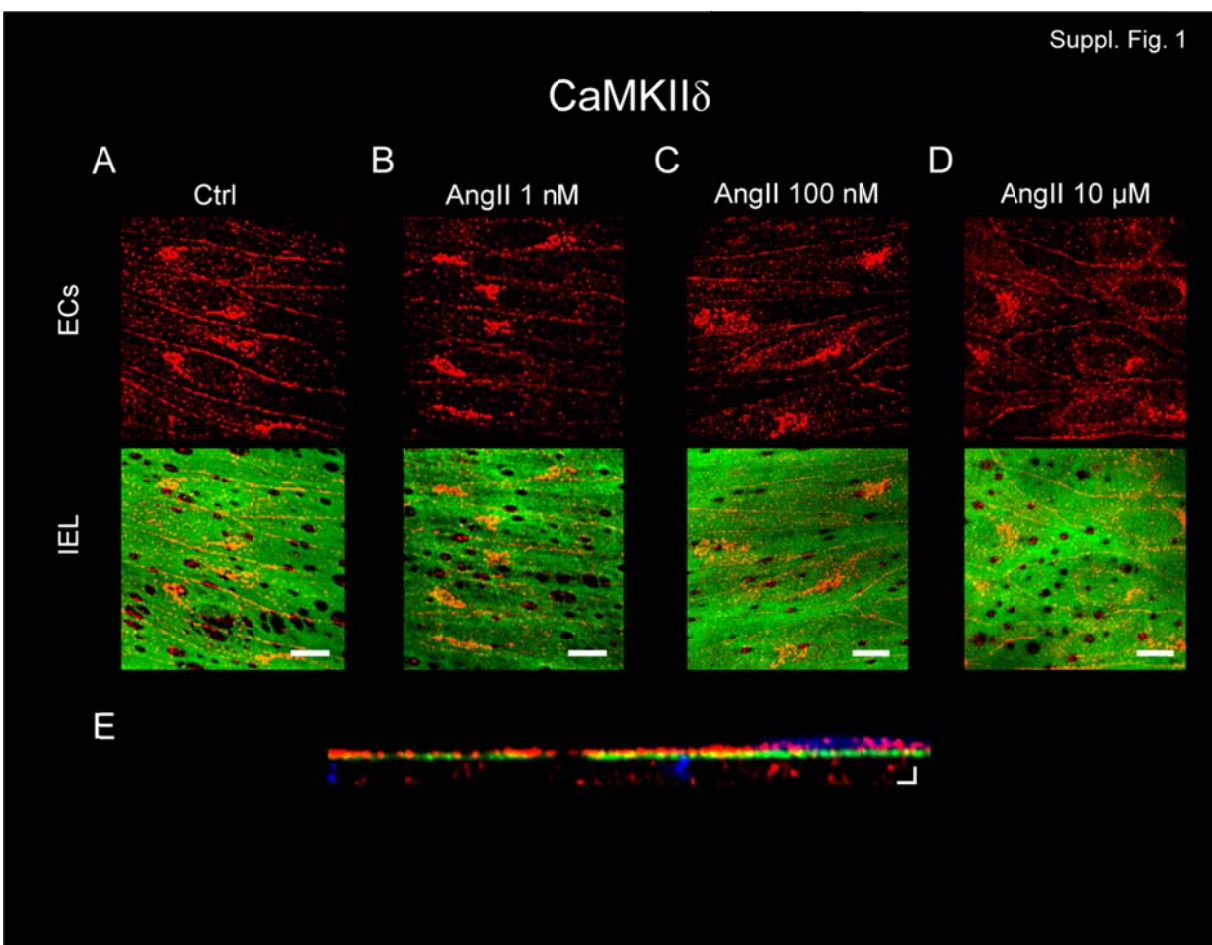
(A-D) Immunostaining of CaMKII $\delta$  (red) in endothelial cells (ECs, top) and with the internal elastic lamina (green) (IEL, lower) in the absence (A) and presence of angiotensin II stimulation (AngII; 0.001  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M; B-D, respectively). Bar: 10  $\mu$ m. (E) Typical cross-sectional view along the z-axis showing CaMKII $\delta$  intracellular distribution in mesenteric arteries following exposure to AngII 10  $\mu$ M. Bar: 2  $\mu$ m.

**Suppl. Fig. 2** Arterial blood pressure in chronic Angiotensin II infusion mice models.

Arterial hypertension was induced by chronic (7 days) infusion of angiotensin II (AngII-AH, 2.74 mg/Kg/d) using osmotic mini-pump, whereas a lower dose of AngII (AngII-NT, 200 ng/Kg/min) did not lead to hypertension. Aortic systolic pressure in AngII-AH (black, n= 10), AngII-NT (gray, n= 16) and Sham (Sham, white, n= 7) mice were collected with a Millar catheter 7 days post-implantation of AngII or saline containing osmotic pump. t-test: \* Sham vs. AngII-AH,  $p < 0.0001$ .

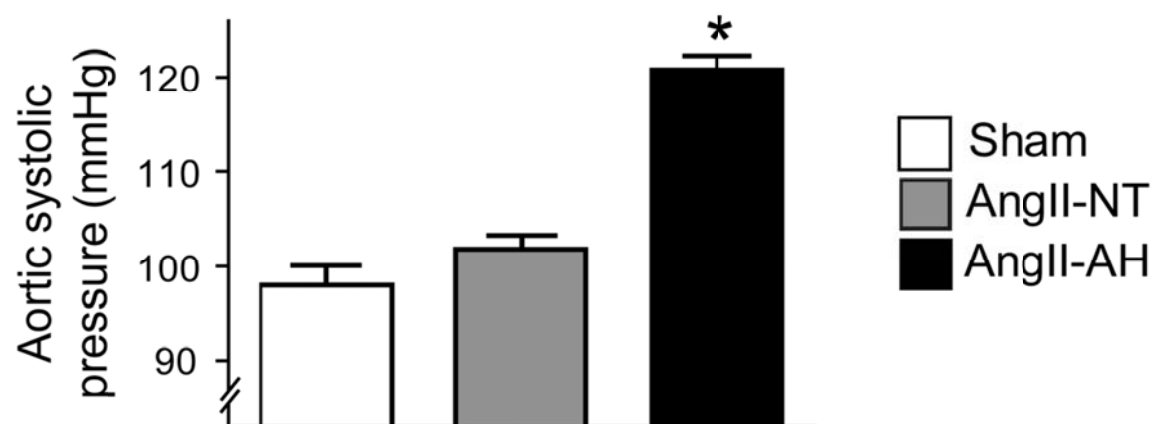
**Suppl. Fig. 3** Intracellular distribution of endothelial CaMKII $\delta$  in mesenteric arteries from chronically AngII-infused mice.

(A-B) Endothelial CaMKII $\delta$  (red) distribution (ECs, top) with the internal elastic lamina (IEL, lower) from (A) AngII normotensive (AngII-NT) and (B) AngII-induced hypertensive (AngII-AH) mice. (C) Typical cross-sectional view along the z-axis showing CaMKII $\delta$  distribution in mesenteric arteries from AngII-AH mice. Bar: 2  $\mu$ m. (D) CaMKII $\delta$  clusters densities analysis within IEL fenestrations in mesenteric arteries from NT (white, n= 8), AngII-NT (gray, n= 8) and AngII-AH (black, n= 9) mice. t-test: \* NT vs. AngII-AH,  $p < 0.05$ .

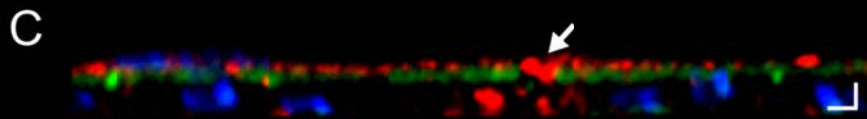
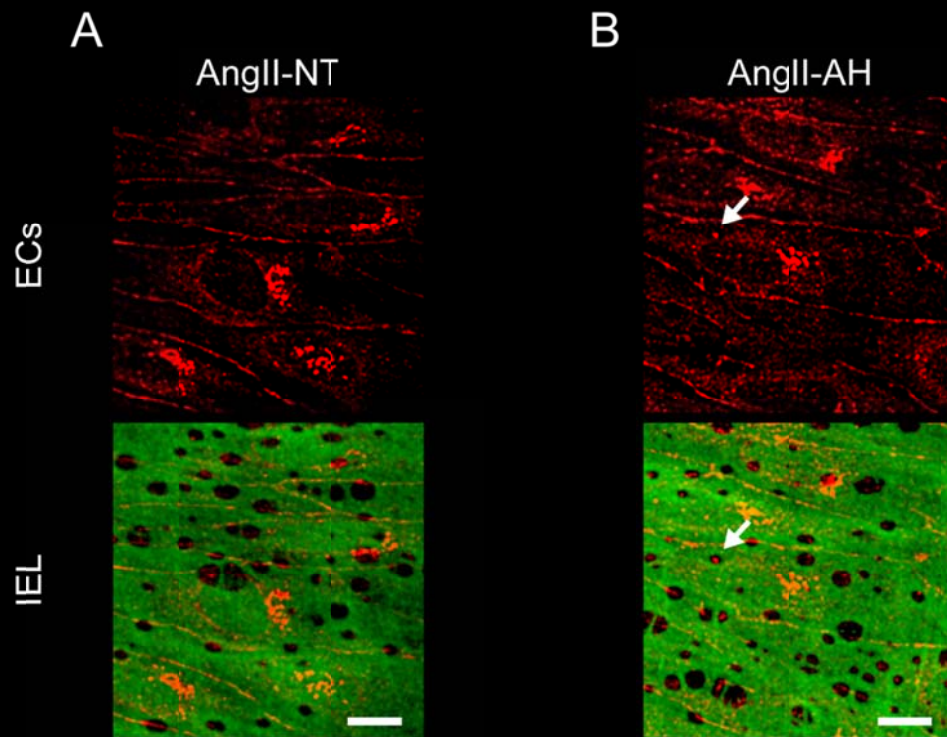




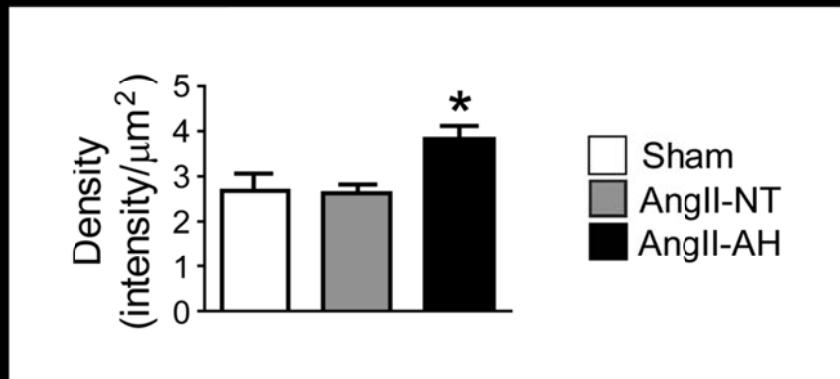
Suppl. Fig. 2



# CaMKII $\delta$



**D**



## Article 3

**Charbel C.**, Dayeh N. R., Taylor M.S., Dupuis J., Comtois P., Ledoux J., Localized endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  signaling is strongly conserved amongst vascular beds. En préparation.

### Apport original et contribution des coauteurs

Titre : Functional activation of endothelial CaMKII by  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains.

Auteurs : Chimène Charbel, Nour R. Dayeh, Blanchette A., Mark S. Taylor, Jocelyn Dupuis, Philippe Comtois et Jonathan Ledoux.

Ce manuscrit est en préparation.

#### Contribution des auteurs :

**Chimène Charbel** : Auteure principale du manuscrit ayant élaboré les hypothèses et objectifs du projet, ainsi que la conception et le design expérimental, effectué les expériences, la cueillette et l'analyse des données, l'interprétation des résultats et la préparation du manuscrit.

**Nour Dayeh** : Coauteure ayant effectué les expériences et la cueillette de donnée sur les artères pulmonaires, effectué l'analyse de données et participé à l'approbation de la version finale du manuscrit.

**Alexandre Blanchette** : Coauteur ayant participé à la cueillette des données d'immunofluorescence et à l'approbation de la version finale du manuscrit.

**Mark S. Taylor** : Coauteur ayant participé à l'élaboration du projet et participé à l'approbation de la version finale du manuscrit.

**Jocelyn Dupuis** : Coauteur ayant participé à l'élaboration du projet et participé à l'approbation de la version finale du manuscrit.

**Philippe Comtois** : Coauteur ayant créé et élaboré le design expérimental d'un algorithme dans Matlab (ATIFIsNI), nécessaire à la quantification des données d'immunofluorescence et ayant participé à l'approbation de la version finale du manuscrit.

**Jonathan Ledoux** : Directeur de thèse et investigateur principal ayant supervisé l'ensemble du projet et élaboré le design expérimental, l'analyse des données, l'interprétation des résultats et participé à la révision, correction et approbation de la version finale du manuscrit.

### Mise en contexte de l'article 3

Il est maintenant bien établi que la communication bidirectionnelle entre les CEs et les CMLVs est essentielle au maintien de l'homéostasie vasculaire. L'endothélium participe au contrôle du tonus vasculaire par la synthèse et la libération de divers facteurs. L'identification de microdomaines a permis de montrer l'implication importante des PMEs dans la communication bidirectionnelle ainsi que dans la régulation du tonus vasculaire [38, 58]. Par exemple, un mécanisme de rétroaction myoendothéliale a récemment été proposé pouvant moduler la réponse vasoconstrictrice [29]. Des études récentes ont montré que les dynamiques calciques présentes dans les PMEs jouent un rôle crucial dans la régulation de tonus vasculaire *via* l'EDHF [19, 42, 228]. Les pulsars calciques ont été la première évidence d'une signalisation calcique restreinte dans les PMEs d'artères mésentériques de souris [19]. Il a été démontré que ce type de signal pouvait activer les canaux KCa3.1 localisés dans les PMEs et ainsi être impliqué dans le mécanisme de l'EDHF afin de moduler la contractilité des CMLVs sous-jacentes. Les TRP-*sparklets* sont également localisés dans les PMEs et ils sont impliqués dans la fonction endothéliale d'artères mésentériques et cérébrales. Les *sparklets* peuvent être déclenchés par différents types de canaux TRPs selon le lit vasculaire. Dans les artères mésentériques, les TRPV4 sont les principaux canaux responsables des *sparklets* alors que dans les artères cérébrales, l'activation des canaux TRPA1, restreints au cerveau, sont également impliqués [228, 321]. Ces résultats suggèrent que les dynamiques calciques locales endothéliales varient selon le lit vasculaire. La caractérisation des pulsars calciques n'a jusqu'alors été réalisée que dans les artères mésentériques.

D'autre part, il a été rapporté que les PMEs, importantes pour les signalisations calciques locales endothéliales ainsi que la structure de la IEL qui les entourent, varient selon le lit vasculaire, l'espèce et les conditions physiopathologiques [12, 27, 32]. En effet, alors que l'artère fémorale de rat ne semble pas contenir de PMEs, les fenestrations de la IEL ainsi que le nombre de PMEs augmentent plus le diamètre du vaisseau diminue [32]. Cette disparité a été corrélée avec l'importance du mécanisme de l'EDHF qui augmente plus le calibre du vaisseau diminue. Ainsi, sachant qu'une relation est établie entre les PMEs et l'EDHF, il est

impératif d'établir une relation entre la structure des microdomaines et les signalisations calciques associées dans différents lits vasculaires.

### **Hypothèses et objectifs de l'article 3**

Sachant que la structure et les propriétés intrinsèques des artères varient selon le lit vasculaire, l'hypothèse principale de cette étude est que les caractéristiques des PME, ainsi que leur signalisation calcique associée, soit les pulsars calciques, diffèrent entre les artères mésentériques, les artères pulmonaires et les artères coronariennes de souris.

Ainsi, l'objectif principal de cette étude a été d'établir une relation entre les PME et les cinétiques des pulsars calciques afin d'en évaluer les différences dans trois lits vasculaires distincts et ainsi améliorer nos connaissances sur les dynamiques calciques endothéliales et leur impact dans la fonction vasculaire.

#### **Les objectifs spécifiques sont :**

- Caractériser la structure de la IEL dans les différents lits vasculaires.
- Caractériser les PME dans les différents lits vasculaires.
- Caractériser les cinétiques des pulsars calciques dans les différents lits vasculaires.
- Évaluer l'impact d'une stimulation spécifique des pulsars calciques avec la PE sur leurs cinétiques dans les différents lits vasculaires.

## Manuscript

### Localized endothelial $\text{Ca}^{2+}$ signaling is strongly conserved amongst vascular beds

Chimène Charbel<sup>1,2</sup>, Nour R. Dayeh<sup>1,3</sup>, Alexandre Blanchette<sup>1</sup>, Mark S. Taylor<sup>6</sup>, Jocelyn Dupuis<sup>1,3</sup>, Philippe Comtois<sup>1,4,5</sup>, Jonathan Ledoux<sup>\*1-4</sup>

\*Corresponding author

**Short title:** Conserved endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains.

---

<sup>1</sup>Research Center, Montreal Heart Institute, Quebec, Canada. <sup>2</sup>Departments of Pharmacology, <sup>3</sup>Medicine, <sup>4</sup>Molecular and Integrative Physiology and <sup>5</sup>Institute of biomedical engineering, Université de Montréal, Quebec, Canada.

<sup>6</sup>Department of Physiology, University of South Alabama College of Medicine, Mobile, AL, USA Correspondence and requests for materials should be addressed to Jonathan Ledoux, Research Center, Montreal Heart Institute.

## Abstract

Endothelial modulation of vascular tone is essentially dependent on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Recent advances suggest that endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains, especially within myoendothelial projections, is important for endothelial-dependent hyperpolarization and vessel relaxation. Reports of different local  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics, including  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars, established their physiological relevance. However, vascular beds and their respective endothelium are specialized and adapted to their distinct environment. It is then unclear how local  $\text{Ca}^{2+}$  signals like  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars differs throughout the vasculature. The characterization of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars and myoendothelial projections, site of these  $\text{Ca}^{2+}$  events was then sought in mesenteric, coronary and pulmonary resistance arteries. Fenestration of the internal elastic lamina, indicator of potential myoendothelial projections location was different between arterial beds with coronary arteries having the most fenestrated lamina. Accordingly, coronary arteries presented the highest density of myoendothelial projections as evidenced by calnexin immunostaining, whilst pulmonary arteries showed the lowest myoendothelial projection density. Endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars from all three vascular beds were practically identical in regards to kinetics, suggesting that  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars are highly conserved amongst resistance arteries. However, the frequency of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars appeared significantly different between the arteries. Mesenteric endothelium is the most active with the highest individual pulsars frequency and number of active sites. Interestingly, all vascular beds tested had a similar response to  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar stimulation through smooth muscle  $\alpha_1$ -adrenergic agonist phenylephrine. This study establishes  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars as a fundamental  $\text{Ca}^{2+}$  signal highly conserved throughout the vasculature. However, structural elements of the vessel wall, such as myoendothelial projections might be responsible for distinct incidence of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars.



## Introduction

Endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  signaling is a central component of endothelial functions, including the regulation of vascular tone. Seminal work showed that stimulation of vascular preparations with endothelial agonists such as bradykinin or ATP is associated with a significant rise of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  accompanied with a vasorelaxation(11, 12). Basically all regulatory pathways originating from the endothelium are activated or modulated to some extent by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Indeed, production of nitric oxide by endothelial nitric oxide synthase (NOS3) is sensitive to intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Generation of arachidonic acid metabolites is also dependent on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels, since phospholipase  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) is modulated by  $\text{Ca}^{2+}$ . Likewise, endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), an amalgam of various mechanisms requires an increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels.

Characterization of vessel wall ultra-structures provided evidence of endothelial cells (ECs) polarity and architecture suggesting intracellular organization promoting subcellular  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains. Although  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) have been shown to be involved in endothelial-dependent regulation of vascular tone (15, 20), distinct role for ion channels subtypes in this process was suggested by a differential localization of  $\text{K}_{\text{Ca}2.3}$  and  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  (14).  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  channels localization within myoendothelial projection (MEPs) allow their activation by  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars and transmission of the hyperpolarization to the underlying smooth muscle (7, 10). Indeed, MEPs are endothelial projections through internal elastic lamina (IEL) fenestrations and making close contact with the underlying smooth muscle cells. The reported endothelium-smooth muscle bi-directional communications through gap junctions occurs within MEPs. Additionally, enrichment of enzymes responsible for endothelial functions such as NOS3,  $\text{IP}_3$  receptors and CaMKII was shown in MEPs (3, 4, 6, 18, 21).

Arterial beds inherently differ in their environment, which enforce specific adaptation to fully achieve their functions, as to regulate optimal blood delivery and pressure to the supplied organ. Indeed, we recently reported differences in phospholipase C (PLC) expression pattern amongst arterial beds(2). Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics essentially rely on PLC production of  $\text{IP}_3$  to stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  release from the endoplasmic reticulum (ER), suggesting differential  $\text{Ca}^{2+}$  signaling throughout the vasculature. Moreover, compelling evidence shows

that  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains are determined by important multiprotein complexes(3, 16, 17, 19) and may vary between vascular beds. Resistance arteries from three considerably different vascular beds were thus studied, first from a structural perspective and then on their respective intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics. Mice coronary (CA), mesenteric (MA) and pulmonary arteries (PA) were compared through their MEPs characteristics and their ER-dependent localized  $\text{Ca}^{2+}$  signals. All arterial preparations evaluated showed distinctive internal elastic lamina structure and the associated MEPs. Whilst  $\text{Ca}^{2+}$  waves were similar,  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar, a spatially restricted endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  signal was significantly different in basal condition (in the absence of stimulation) with mesenteric endothelium being the most active. However, kinetics for  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars were similar in all three arterial types, suggesting that  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar consist of an elementary  $\text{Ca}^{2+}$  signal highly conserved throughout the vascular tree. Specific stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars with acute exposure to phenylephrine (PE) increased  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars frequency in all vessels without modifying intrinsic kinetics. This study provides the first comparative evidence of spatially restricted  $\text{Ca}^{2+}$  signaling amongst arterial beds. The data from this study strongly suggests that  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars might represent a fundamental  $\text{Ca}^{2+}$  signal despite different environmental constraints.

## Material & Methods

### *Tissue preparation.*

Animal procedures used in this study were in accordance with the institutional guidelines and were approved by the Research Center of the Montreal Heart Institute Animal Deontology Committee. Mesenteric arteries (MA) (3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> order diameters  $\approx$  60-100  $\mu$ m), pulmonary arteries (PA) (3<sup>rd</sup> order diameters  $\approx$  60-100  $\mu$ m) and coronary arteries (CA) (2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> order diameters  $\approx$  100-180  $\mu$ m) were isolated from 3-4 months old male C57BL/6 mice. Arteries were dissected and cleaned of connective and adipose tissue prior their mounting on a Sylgard block (cut lengthwise, endothelium facing up) in cooled HEPES solution (134 mM NaCl, 6 mM KCl, 10 mM glucose, 10 mM Hepes, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4). Every set of experiments was performed on 3 to 5 arteries from a minimum of 2 mice.

### *Immunohistochemistry.*

Acute stimulation of Ca<sup>2+</sup> pulsars was made on mounted arteries incubated with phenylephrine (PE; 10  $\mu$ M, 15 minutes). Then, all arteries were fixed with 4% paraformaldehyde (20 minutes) before permeabilization and blocking simultaneously with 0.2% Triton X-100 and 4% normal donkey serum, respectively. Arteries were incubated overnight at 4°C with the primary antibody against calnexin, an endoplasmic reticulum membrane marker (rabbit Calnexin, Abcam Cat. No. ab22595). Tissues were incubated with fluorescent secondary antibody (donkey anti-rabbit Alexafluor 647, Invitrogen, ex/em: 647/670 nm) for 1 hour at room temperature. After several washes, arteries were mounted on a FluoroDish with 4% Dabco (1/10 glycerol). Internal elastic lamina (IEL) autofluorescence was measured at ex/em 488/520 nm, where nuclear staining with DAPI at 405/460 nm. Z-stacks images (0.25  $\mu$ m increments) were acquired using a Zeiss LSM 510 system confocal microscope (63X oil objective, numerical aperture of 1.4) and deconvolved using the Maximum Likelihood estimation algorithm and the appropriate experimentally determined Point Spread Function (PSF) with Huygens Professional software 3.6 (Scientific Volume Imaging, Netherlands). Images were then analysed with zen 2009 light software. Staining for calnexin within myoendothelial projections (MEP), represented as perforations in the IEL, was quantified with a custom-designed ATIFIsNI algorithm, created in Matlab v7.0.1 (The Mathworks inc., MA).

### ***Endothelial $\text{Ca}^{2+}$ high-speed confocal imaging***

$\text{Ca}^{2+}$  pulsars imaging was assessed in MA, PA and CA loaded with Fluo-4 (10  $\mu\text{M}$ , 45 min at 37°C) at 37°C in a physiological salt solution (PSS; 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 24 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1.2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 11 mM Glucose and 1.5 mM  $\text{CaCl}_2$ ). High-speed confocal imaging ( $\approx 15$  frames/sec) at ex/em 488/510 was performed using an Andor Revolution confocal system (Andor Technology) with an iXon EMCCD camera on an upright Nikon microscope and a 60X, water-dipping objective (NA 1.0). Images were also acquired after specific stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars with PE. Recorded Fluo-4 fluorescence with Andor iQ 2.8 software (Andor Technology) was then analyzed offline using SparkAn software (A. Bonev, UVM) by measuring the fluorescence intensity ( $F$ ) relative to baseline ( $F_0$ ). Analysis of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars fractional fluorescence ( $F/F_0$ ) was performed using a  $5 \times 5$  pixel box region of interest (ROI) positioned at the peak pulsar amplitude.

### ***Statistical analysis.***

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software. Data's from unpaired t-test were presented as mean  $\pm$  SEM. Significant values were considered at  $p < 0.05$ .

## Results

### *Endothelium-smooth muscle interface*

The IEL is the only structure between vascular endothelium and the underlying smooth muscle cells. Taking advantage of its autofluorescent properties, mapping of IEL from mice mesenteric (MA), pulmonary (PA) and coronary arteries (CA) was performed using scanning confocal microscopy. IEL fenestrations from the three arterial types are qualitatively different (Figure 1A). Analysis with ATIFIsNI, custom-designed image analysis algorithm, provided further metrics in regards to IEL coverage in arteries. Incidence of IEL fenestrations as well as the total area covered by IEL fenestrations was found to be two-fold greater in CA than in PA and MA (Figure 1Ba & b). Interestingly, this higher fenestrated area in CA is not associated with larger individual fenestrations, as mean surface of IEL fenestrations is not significantly different from PA. However, MA has prominent IEL fenestrations, significantly larger than their corresponding structures in PA and CA ( $2.9 \pm 0.1$  vs.  $2.1 \pm 0.1$  and  $2.46 \pm 0.1 \mu\text{m}^2$ , for MA, PA and CA, respectively) (Figure 1Bc).

Myoendothelial projections can only occur within IEL fenestrations. However, holes in IEL do not necessarily guarantee the presence of MEPs at this exact location. Calnexin, an ER-restricted  $\text{Ca}^{2+}$  binding protein was then used as a surrogate to elucidate the presence of ER, and thence cytoplasmic protrusion within IEL fenestrations. Calnexin fluorescence was analyzed using deconvolved z-stacks of images (Figure 2Ab) with ATIFIsNI. As expected from the IEL fenestrations data, CA appears to have the highest incidence and surface covered by MEPs (Figure 2Ba & b). Interestingly, mesenteric arteries show the highest efficiency ratio with 65% of IEL fenestrations marked with calnexin fluorescence compared to 32% and 39% for pulmonary and coronary arteries, respectively (Figure 2Bc). However, despite significant variations in IEL fenestration size, surface covered by individual MEPs is similar in all three arterial types (Figure 2Bd).

### *Basal $\text{Ca}^{2+}$ dynamics in arterial endothelium*

MEP and IEL fenestration being essential to ER-based endothelial localized  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics, characterization of basal endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  signaling was then sought. Intracellular

$\text{Ca}^{2+}$  dynamics were recorded in Fluo-4 loaded endothelium *in situ* as previously (10) from MA, CA and PA.  $\text{Ca}^{2+}$  waves were similar in all preparations, with very few occurrences over the recording period. Spatially restricted  $\text{Ca}^{2+}$  increase near IEL fenestrations was identified in all three preparations. Amplitude and kinetics of the  $\text{Ca}^{2+}$  signals recorded (Table 1) as well as their location are in accordance with the previously described  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars in mesenteric arteries(10). All kinetic parameters evaluated were similar in all three preparations (Table 1). Although the area covered by individual  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars was similar in MA and PA,  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar spreading was significantly smaller in CA. Besides spreading, fundamental properties of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars in CA and PA matches those in MA, suggesting that a singular type of event was detected in all three vessel types.

Pulmonary arteries were however different from mesenteric or coronary arteries in respect to occurrence of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars. Although similar populations of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar active sites were detected in CA and MA, active sites were twice less numerous in PA ( $12 \pm 2$  vs.  $22 \pm 3$  and  $22 \pm 3$  for PA, MA and CA, respectively) (Figure 3Ac). In resting conditions (i.e. in the absence of any stimulation), the mean frequency of individual  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar sites was also significantly lower in PA compared to MA and CA (Figure 3Ab). Accordingly, total  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar frequency, representing the number of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars recorded within the entire field of view per second, is approximately three- and two-fold higher in MA and CA than in PA (Figure 3Aa).

#### *Smooth muscle-dependent stimulation of $\text{Ca}^{2+}$ pulsars*

Endothelium-smooth muscle bi-directional communication occurs through MEPs. Myocyte modulation of endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  signaling has been reported following stimulation of  $\alpha 1$ -adrenergic receptors with phenylephrine (PE)(1, 3). Based on the IEL-MEPs data described above, vascular bed differences in smooth muscle-dependent stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars were investigated. Acute exposure of MA to PE (10  $\mu\text{M}$ ) significantly increased total  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars frequency in the endothelium (Figure 3Ba), as previously reported(3). A significant increase in total  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar frequency was also observed in CA ( $203 \pm 31\%$  of control) and PA ( $251 \pm 29\%$  of control). Although frequency of PE-induced  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar seems higher in PA, no statistical differences were found between arterial preparations. Similarly,

firing rate of individual  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar sites from all arteries were increased by PE (Figure 3Bb); with a slightly more prominent, although not statistically significant, increase in PA. Interestingly, PE exposure recruited about 25-50% *de novo* sites in all three arteries ( $144 \pm 5\%$ ,  $149 \pm 15\%$  and  $127 \pm 5\%$  of control for MA, PA and CA, respectively) (Figure 3Bc). Moreover, application of PE did not alter the intrinsic characteristics of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars as no differences were found in amplitude or kinetics parameters of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars (Table 2).

## Discussion

Endothelial intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  level is critical to vascular tone modulation and a growing body of evidence suggests that  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains are key players in endothelial functions. Building on previous reports of endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations (7),  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars, a spontaneous  $\text{IP}_3\text{R}$ -dependent  $\text{Ca}^{2+}$  release event uniquely positioned at MEPs were first characterized in mesenteric endothelium from mouse (10). This oscillatory  $\text{Ca}^{2+}$  signal was shown to hyperpolarize membrane through activation of  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  channels. These  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels, strategically positioned within MEPs are involved in EDHF response.  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars also stimulate nitric oxide production within MEPs (3, 4). In rat cremaster arterioles,  $\text{Ca}^{2+}$  wavelets were shown to be similar to  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars with respect to the localization but the area covered by the transient  $\text{Ca}^{2+}$  signal is significantly larger (22). In addition to spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  release from ER stores, non-propagating  $\text{Ca}^{2+}$  influx through TRP channels was also identified in endothelium, TRP-sparklets, analogously to  $\text{Ca}^{2+}$  influx through Cav2.1 channels described in myocytes. So far, two TRP channels have been shown to contribute to local  $\text{Ca}^{2+}$  influx in endothelial cells, TRPV4 and TRPA1, respectively named TRPV4-sparklets (16, 17) and TRPA1-sparklets (13, 19). Noteworthy, TRPA1-sparklets are specific to the cerebral vasculature(13, 19), strengthening the concept of vascular bed differences in  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains.

Within the skeletal microcirculation, structural differences have been reported according to the arterial diameter (8). IEL overlay of the endothelium-smooth muscle interface was different between large and small arteries. Differences were also noted between skeletal and mesenteric arteries. Accordingly, significant differences were found between the arterial preparations evaluated in this study. Indeed, coronary circulation has the smallest IEL coverage, and accordingly the highest IEL fenestrations count and total fenestration surface. On the other hand, pulmonary and mesenteric arteries were similar in number of IEL fenestrations. Interestingly, mesenteric arteries are the one with the largest individual fenestrae. IEL fenestration is a relatively slow process requiring enzymes such as metalloproteinase, and part of the blood vessel wall remodeling. This process can be accelerated in response to several stimuli or by a modification of the arterial environment. For example, aging has been shown to increase fenestrae size and incidence (23) as well as



hypercholesterolemia(9). However, in the current study, all vessels were collected from healthy and age-matched animals. Therefore, aging or pathophysiological status would not explain the observed discrepancy between arterial wall anatomies. MEPs, as evidenced by the use of calnexin as surrogate for ER, were also different amongst arteries regardless of similar individual MEP surface. Calnexin, an ER-sequestered protein will help identify IEL fenestrations containing ER, which are assumed to be a cellular projection. However, MEP without ER can be present within an IEL fenestration and would not be detected in the experimental design used. In accordance with the IEL fenestration data, MEP incidence and coverage was found to be larger in coronary arteries. However, the role of such high MEP density in coronary circulation remains to be determined. Interestingly, mesenteric arteries showed the highest MEP-to-IEL fenestration incidental index. Alteration in these relative differences between arterial beds would be expected in pathophysiological conditions. For example, pulmonary hypertension or atherosclerosis are associated with vessel wall remodeling and would result in modification in MEP and IEL fenestrations. These pathophysiological conditions are also associated with progressive endothelial dysfunction. Such loss of endothelial capacity to regulate vascular hemostasis correlates with  $\text{Ca}^{2+}$  dyshomeostasis.

$\text{Ca}^{2+}$  pulsars are spontaneous ER  $\text{Ca}^{2+}$  release events through endothelial  $\text{IP}_3\text{R}$  located at MEPs. The amplitude as well as kinetics parameters of the  $\text{Ca}^{2+}$  signal are similar in mesenteric, coronary and pulmonary arteries. Moreover, stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars *via* smooth muscle  $\alpha_1$ -adrenergic receptors with PE had no effect on these parameters. This suggests that  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars are fundamental  $\text{Ca}^{2+}$  events originating from the ER. It also suggests that the different components regulating  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis (SERCA pumps, etc.) are similar in these subcellular compartments. On the other hand, populations of active  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar sites are significantly different between arteries in resting conditions. Pulmonary arteries showed significantly smaller population of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars sites and reduced global  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar frequency. This correlates with a lower MEP occurrence, providing fewer anatomical structures essential to  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars. Recent computational modeling suggests that high incidence of myoendothelial communications is not necessary to achieve optimal effect (5) suggesting that similar endothelial modulation of arterial tone can be obtained with fewer

MEPs. However, this subcellular configuration could not explain the lower unitary  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar frequency. This difference in  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars found in pulmonary arteries might be due to experimental conditions. Indeed, given that the pulmonary vasculature is a low resistance/high flow system and that endothelial intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics are sensitive to shear stress, one would expect that resting conditions for pulmonary vasculature would require higher flow. Therefore, resting  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars dynamics might be similar to coronary or mesenteric endothelium in more physiological conditions. However, in order to compare endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics with minimal variability in the experimental conditions, all arterial preparations were exposed to the same experimental conditions of flow, temperature and pressure. Further work will be required to establish the impact of flow/shear stress on  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars, especially in arteries exposed to high flow such as pulmonary arteries or intermittent perfusion like coronary arteries.

Specific stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars through smooth muscle  $\alpha$ -adrenergic receptors was similar in all arterial beds tested. This is an unexpected finding, especially considering distinct MEP densities in pulmonary or coronary arteries. Indeed, less MEPs found in pulmonary arteries would have been expected to result in a lower PE potency to recruit *de novo*  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar sites. However, MEPs identification was limited by the use of a ER marker in immunohistochemistry and confocal microscopy. Presence of ER within IEL fenestrations strongly suggests a correlated endothelial/myocyte protrusion, described as MEPs. However, the presence of MEP within IEL fenestrae does not guarantee direct heterocellular communications. Smooth muscle stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar requires a direct communication with the endothelium through gap junctions as carbenoxolone, a connexin inhibitor abolish PE-induced stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars.

This study establishes that  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars are elementary  $\text{Ca}^{2+}$  release events highly conserved amongst arteriolar endothelium from different vascular beds. Moreover, MEPs and IEL fenestrations are essential to  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars occurrence and incidence as these anatomical structures correlate with greater populations of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar sites and unitary frequency. These results suggest that in pathological conditions requiring stronger endothelial modulation of smooth muscle tone, enhanced MEPs and thus  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars might represent an interesting therapeutic avenue.

## **Acknowledgements**

This work was supported by CIHR (J.L.), FRQS (J.L.) and Heart & Stroke Foundation of Canada (J.L.) and through scholarships by FICM (C.C.), Université de Montréal (C.C., N.R.D.). The authors are thankful to Delphine Béziau and Fanny Toussaint for critical review of the manuscript.

**Table 1.** Basal  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars kinetics in endothelium from mesenteric, pulmonary and coronary arteries

$\text{Ca}^{2+}$ pulsar parameter	Mesenteric arteries	Pulmonary arteries	Coronary arteries
<b>Amplitude (<math>F/F_o</math>)</b>	$1.55 \pm 0.08$	$1.58 \pm 0.14$	$1.61 \pm 0.07$
<b>Rise (ms)</b>	$308 \pm 11$	$292 \pm 10$	$282 \pm 6$
<b>Duration (ms)</b>	$407 \pm 35$	$460 \pm 12$	$417 \pm 15$
<b><math>t_{1/2}</math> (ms)</b>	$227 \pm 11$	$250 \pm 5$	$216 \pm 12$

Kinetic parameters of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars in Fluo-4 loaded endothelium from mesenteric, pulmonary and coronary arteries in the absence of stimulation.  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars parameters are characterized in terms of peak amplitude measured as  $F/F_o$ , rise time measured as upstroke time required for 10-90% of peak amplitude, duration measured as the time between 50% of the signal before and after the peak and half-time decay ( $t_{1/2}$ ) measured as time between the peak and 50% of its amplitude.

**Table 2.** Effect of phenylephrine on  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars kinetics in endothelium from mesenteric, pulmonary and coronary arteries

$\text{Ca}^{2+}$ pulsar parameter	% of control		
	Mesenteric arteries	Pulmonary arteries	Coronary arteries
<b>Amplitude</b>	$93 \pm 1$	$97 \pm 2$	$95 \pm 4$
<b>Rise</b>	$98 \pm 3$	$106 \pm 2$	$106 \pm 3$
<b>Duration</b>	$99 \pm 35$	$100 \pm 2$	$106 \pm 6$
<b><math>t_{1/2}</math></b>	$102 \pm 2$	$99 \pm 2$	$109 \pm 6$

Kinetic parameters of  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars in Fluo-4 loaded endothelium from mesenteric, pulmonary and coronary arteries in the presence of phenylephrine, a  $\alpha_1$ -adrenergic agonist (10  $\mu\text{M}$ ).  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars parameters are expressed as % of the values recorded in control conditions, i.e. in the absence of stimulation or agonist.  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars are characterized in terms of peak amplitude measured as  $F/F_o$ , rise time measured as upstroke time required for 10-90% of peak amplitude, duration measured as the time between 50% of the signal before and after the peak and half-time decay ( $t_{1/2}$ ) measured as time between the peak and 50% of its amplitude.

## Figure Legends

**Figure 1.** *Internal elastic lamina fenestration of mesenteric, pulmonary and coronary arteries from mice*

**A.** Typical image of autofluorescent fenestrated internal elastic laminae (IEL, green) from mesenteric (MA), pulmonary (PA) and coronary (CA) arteries. Bar = 10  $\mu$ m **B.** Bar graph summarizing IEL fenestration metrics in mesenteric (MA, white, n=6), pulmonary (PA, green, n=7) and coronary (CA, blue, n=9) arteries. \*p< 0.05.

**Figure 2.** *Myoendothelial projections within IEL fenestrations of mesenteric, pulmonary and coronary arteries*

**Aa.** Typical images of immunostaining for calnexin (red), a protein sequestered in the endoplasmic reticulum at a focal plane corresponding to the IEL (green) in mesenteric (MA), pulmonary (PA) and coronary (CA) arteries. Bar = 10  $\mu$ m **Ab.** Cropped views from z-stacks of images as in (a) showing calnexin staining throughout IEL fenestrations. **Ba-d.** Bar graphs reporting calnexin densities analysis within IEL fenestrations from mesenteric (MA, white, n=6), pulmonary (PA, green, n=7) and coronary (CA, blue, n=9) arteries. \*p< 0.05.

**Figure 3.** *Comparative endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar activities in freshly isolated mesenteric, pulmonary and coronary arteries in resting conditions and in the presence of phenylephrine.*

**A.** Basal  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar activity monitored with high-speed confocal imaging in mesenteric (MA, white, n=5), pulmonary (PA, green, n=4) and coronary (CA, blue, n=5) arteries and expressed as **(a)** global  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar frequency, **(b)** individual  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar frequency per site and **(c)** number of active  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar sites in the absence of stimulation. \*p< 0.05 **B.** Endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  pulsars stimulation by phenylephrine in mesenteric (MA, white, n=5), pulmonary (PA, green, n=4) and coronary (CA, blue, n=5) arteries and expressed as % of change from control (absence of stimulation) of **(a)** global  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar frequency, **(b)** individual  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar frequency per site and **(c)** number of active  $\text{Ca}^{2+}$  pulsar sites. \*p< 0.05.

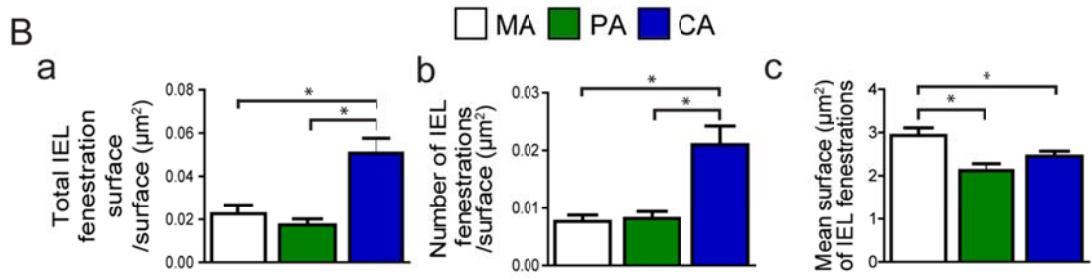
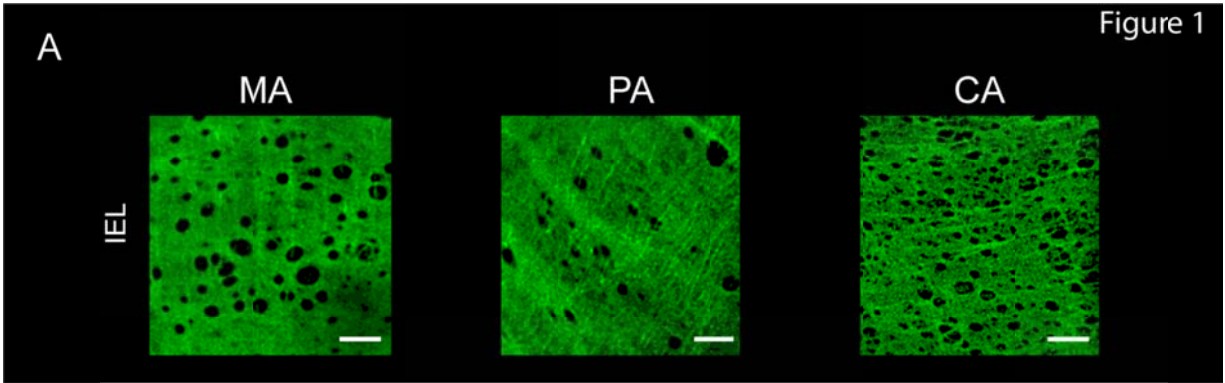
## References

1. **Bagher P, Beleznaï T, Kansui Y, Mitchell R, Garland CJ, Dora KA.** Low intravascular pressure activates endothelial cell TRPV4 channels, local Ca<sup>2+</sup> events, and IKCa channels, reducing arteriolar tone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 18174–18179, 2012.
2. **Béziau DM, Toussaint F, Blanchette A, Dayeh NR, Charbel C, Tardif J-C, Dupuis J, Ledoux J.** Expression of Phosphoinositide-Specific Phospholipase C Isoforms in Native Endothelial Cells. *PLoS ONE* 10: e0123769, 2015.
3. **Charbel C, Toussaint F, Béziau DM, Gillis M-A, Blanchette A, Mamarbachi M, Bousette N, Comtois P, Ledoux J, ledoux.** Functional activation of endothelial CaMKII by Ca<sup>2+</sup> microdomains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
4. **Charbel C, Toussaint F, Gillis M-A, Blanchette A, Comtois P, Ledoux J.** New insights on endothelial Ca<sup>2+</sup> microdomains and CaMKII in Angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*.
5. **Hald BO, Jacobsen JCB, SANDOW SL, Holstein Rathlou NH, Welsh DG.** Less is more: minimal expression of myoendothelial gap junctions optimizes cell-cell communication in virtual arterioles. *The Journal of Physiology* 592: 3243–3255, 2014.
6. **Isakson BE.** Localized expression of an Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> receptor at the myoendothelial junction selectively regulates heterocellular Ca<sup>2+</sup> communication. *Journal of Cell Science* 121: 3664–3673, 2008.
7. **Kansui Y, Garland CJ, Dora KA.** Enhanced spontaneous Ca<sup>2+</sup> events in endothelial cells reflect signalling through myoendothelial gap junctions in pressurized mesenteric arteries. *Cell Calcium* 44: 135–146, 2008.
8. **Kirby BS, Bruhl A, Sullivan MN, Francis M, Dinunno FA, Earley S.** Robust internal elastic lamina fenestration in skeletal muscle arteries. *PLoS ONE* 8: e54849, 2013.

9. **Kwon HM, Sangiorgi G, Spagnoli LG, Miyauchi K, Holmes DR, Schwartz RS, Lerman A.** Experimental hypercholesterolemia induces ultrastructural changes in the internal elastic lamina of porcine coronary arteries. *Atherosclerosis* 139: 283–289, 1998.
10. **Ledoux J, Taylor MS, Bonev AD, Hannah RM, Solodushko V, Shui B, Tallini Y, Kotlikoff MI, Nelson MT.** Functional architecture of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in restricted spaces of myoendothelial projections. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 9627–9632, 2008.
11. **Lückhoff A, Busse R.** Increased free calcium in endothelial cells under stimulation with adenine nucleotides. *J Cell Physiol* 126: 414–420, 1986.
12. **Morgan-Boyd R, Stewart JM, Vavrek RJ, Hassid A.** Effects of bradykinin and angiotensin II on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in endothelial cells. *Am J Physiol* 253: C588–98, 1987.
13. **Qian X, Francis M, Solodushko V, Earley S, Taylor MS.** Recruitment of dynamic endothelial  $\text{Ca}^{2+}$  signals by the TRPA1 channel activator AITC in rat cerebral arteries. *Microcirculation* 20: 138–148, 2013.
14. **SANDOW SL, Neylon CB, Chen MX, Garland CJ.** Spatial separation of endothelial small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels (KCa) and connexins: possible relationship to vasodilator function? *Journal of Anatomy* 209: 689–698, 2006.
15. **Si H.** Impaired Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Mediated Dilations and Increased Blood Pressure in Mice Deficient of the Intermediate-Conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -Activated  $\text{K}^{+}$  Channel. *Circulation Research* 99: 537–544, 2006.
16. **Sonkusare SK, Bonev AD, Ledoux J, Liedtke W, Kotlikoff MI, Heppner TJ, Hill-Eubanks DC, Nelson MT.** Elementary  $\text{Ca}^{2+}$  Signals Through Endothelial TRPV4 Channels Regulate Vascular Function. *Science* 336: 597–601, 2012.

17. **Sonkusare SK, Dalsgaard T, Bonev AD, Hill-Eubanks DC, Kotlikoff MI, Scott JD, Santana LF, Nelson MT.** AKAP150-dependent cooperative TRPV4 channel gating is central to endothelium-dependent vasodilation and is disrupted in hypertension. *Science Signaling* 7: ra66–ra66, 2014.
18. **Straub AC, Billaud M, Johnstone SR, Best AK, Yemen S, Dwyer ST, Looft-Wilson R, Lysiak JJ, Gaston B, Palmer L, Isakson BE.** Compartmentalized connexin 43 s-nitrosylation/denitrosylation regulates heterocellular communication in the vessel wall. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31: 399–407, 2011.
19. **Sullivan MN, Gonzales AL, Pires PW, Bruhl A, Leo MD, Li W, Oulidi A, Boop FA, Feng Y, Jaggar JH, Welsh DG, Earley S.** Localized TRPA1 channel Ca<sup>2+</sup> signals stimulated by reactive oxygen species promote cerebral artery dilation. *Science Signaling* 8: ra2–ra2, 2015.
20. **Taylor MS.** Altered Expression of Small-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> (SK3) Channels Modulates Arterial Tone and Blood Pressure. *Circulation Research* 93: 124–131, 2003.
21. **Toussaint F, Charbel C, Blanchette A, Ledoux J.** CaMKII regulates intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics in native endothelial cells. *Cell Calcium*.
22. **Tran CHT, Kurjiaka D, Welsh DG.** Emerging trend in second messenger communication and myoendothelial feedback. *Front Physio* 5, 2014.
23. **Wong LC, Langille BL.** Developmental remodeling of the internal elastic lamina of rabbit arteries: effect of blood flow. *Circulation Research* 78: 799–805, 1996.





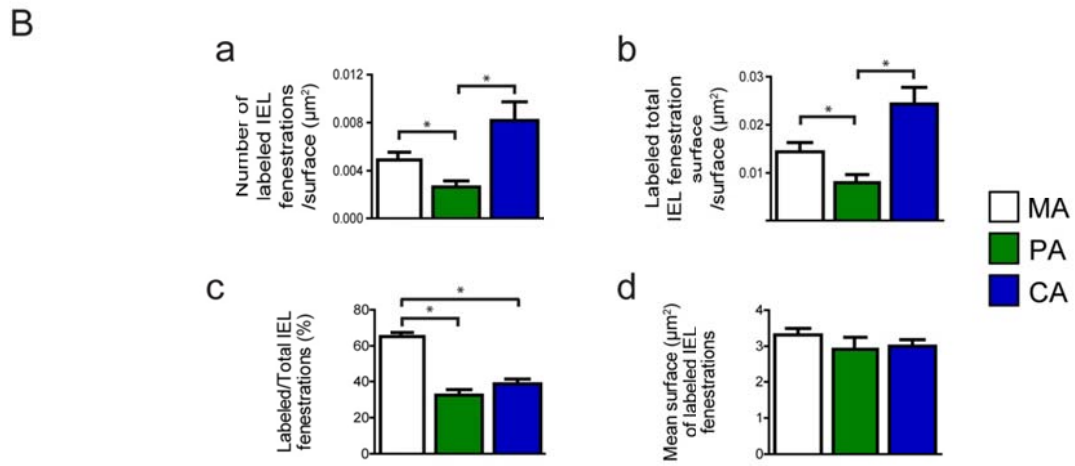
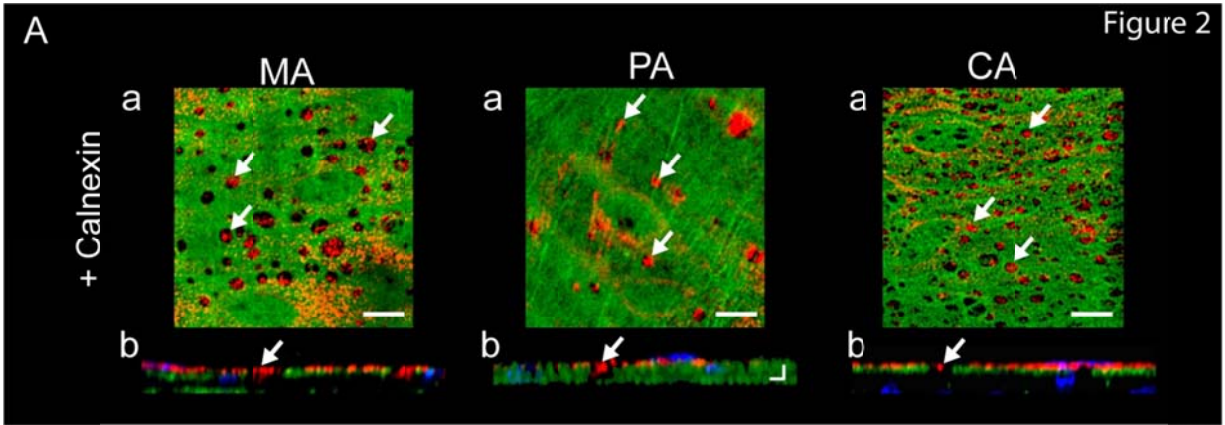
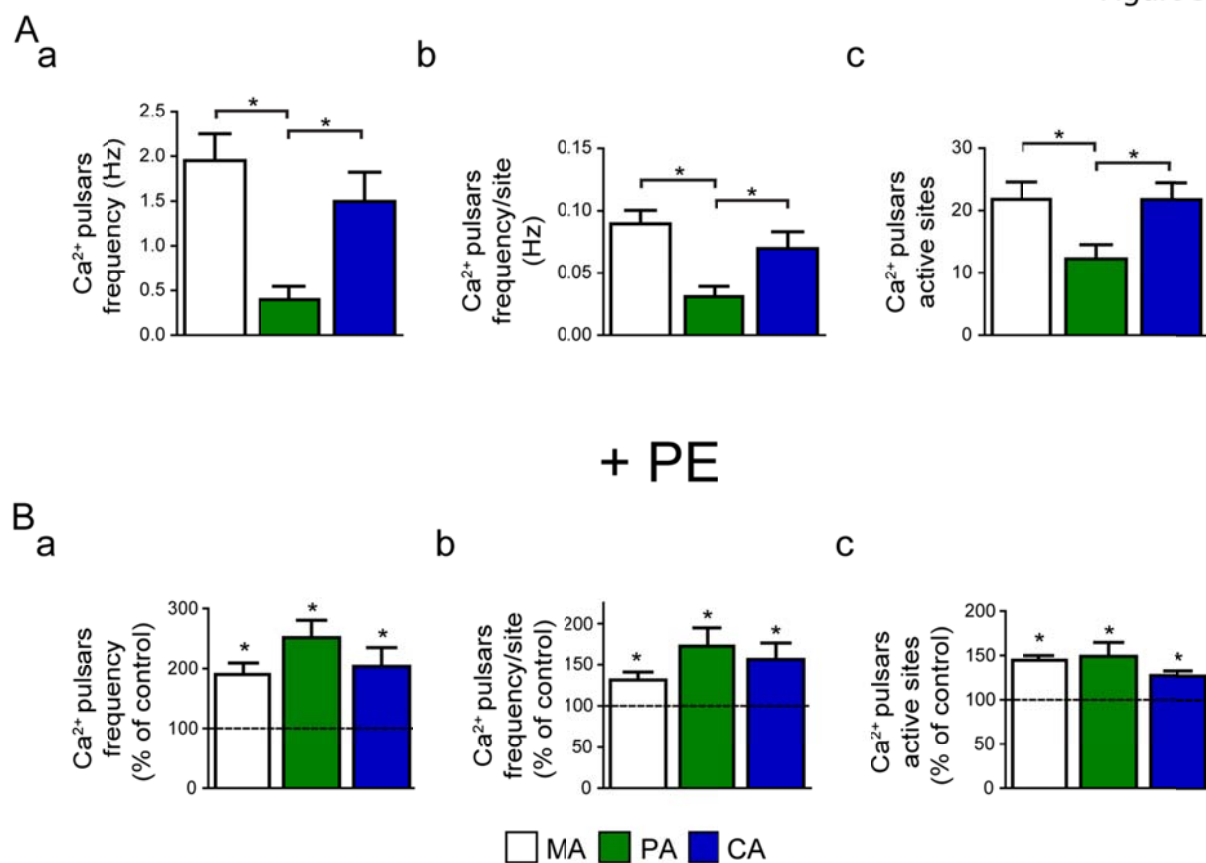


Figure 3



## **DISCUSSION**

## Discussion

Les données de la littérature appuient fortement l'existence d'une relation importante entre les dynamiques calciques endothéliales et la régulation du tonus vasculaire. Une perturbation de l'homéostasie calcique endothéliale est observée dans une dysfonction endothéliale associée à l'hypertension. Le  $\text{Ca}^{2+}$  étant un instigateur de la synthèse et de la libération de nombreux médiateurs endothéliaux responsables du contrôle du tonus vasculaire, il est impératif de comprendre les diverses dynamiques calciques endothéliales ainsi que leurs voies de signalisations. Un nombre croissant d'évidences montre qu'une variation locale du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est suffisante pour provoquer un effet physiologique d'envergure importante. Une augmentation localisée avec une faible propagation du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  a la capacité de finement moduler les fonctions cellulaires sans affecter l'ensemble des mécanismes sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$ . Les pulsars calciques caractérisés par une augmentation spontanée et transitoire de  $\text{Ca}^{2+}$  spécifiquement au niveau des PME semblent jouer un rôle important dans le contrôle du tonus vasculaire en étant impliqués dans le mécanisme de l'EDHF. En effet, les pulsars calciques ont la capacité d'activer les canaux  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  et ainsi provoquer la relaxation des CMLVs. Parmi les diverses autres protéines sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$ , CaMKII a la caractéristique unique de décoder et d'intégrer les oscillations calciques intracellulaires, suggérant un rôle potentiel d'effecteur des pulsars calciques.

L'importance des dynamiques calciques locales présentes dans des PME a également été mise en évidence par des études récentes montrant l'implication des TRPs-sparklets dans la régulation du tonus vasculaire *via* le mécanisme de l'EDHF. Ces travaux ont montré une variabilité du type de canaux TRPs provoquant l'influx calcique en fonction du lit vasculaire. Dans les artères mésentériques, TRPV4 est le canal principalement responsable alors que dans les artères cérébrales ce rôle appartient à TRPA1. Par ailleurs, des travaux de notre laboratoire ont également démontré des différences dans l'expression des isoformes de la PLC, possédant des propriétés intrinsèques distinctes dans les CE selon le lit vasculaire. Ces résultats suggèrent que les dynamiques calciques pourraient varier selon le lit vasculaire, compte tenu du rôle de la PLC dans l'augmentation de l' $\text{IP}_3$  et du  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Les caractéristiques des pulsars calciques dans différents lits vasculaires n'ont pas encore été établies. Les différences entre les

lits vasculaires ne se limitent pas aux voies de signalisations intracellulaires. La structure des vaisseaux ainsi que les PMEs varient également selon le type vasculaire d'où l'importance de caractériser les différences entre les lits vasculaires afin de mieux comprendre leur implication dans la fonction vasculaire.

Les études menées dans le cadre de cette thèse ont visé à identifier l'expression et la localisation de CaMKII dans l'endothélium d'artères mésentériques de souris et d'évaluer la contribution des pulsars calciques dans l'activation de CaMKII sous diverses conditions. D'une part, nous avons démontré que les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$  de CaMKII sont exprimées dans l'endothélium vasculaire, alors qu'uniquement  $\alpha$  et  $\beta$  sont localisés dans les PMEs, les sites des pulsars calciques. Ensuite, des expériences d'immunofluorescence ont permis de montrer qu'une stimulation des pulsars calciques engendre un recrutement de CaMKII activée dans les PMEs. Cette relation particulière joue un rôle important dans la production de NO, puisqu'une inhibition de CaMKII diminue la stimulation de la production de NO par les pulsars calciques. D'ailleurs, une inhibition de CaMKII avec le KN-93 diminue la NOS3 activée dans les PMEs. Nous avons également montré que la relation entre les pulsars calciques et CaMKII est altérée dans deux modèles d'hypertension artérielle (PE et AngII). L'originalité des travaux de cette thèse réside dans l'identification des isoformes de CaMKII présentes dans l'endothélium vasculaire et d'une nouvelle voie de signalisation gouvernée par les pulsars calciques pouvant potentiellement être impliquée dans la régulation du tonus vasculaire *via* l'activation de CaMKII.

### **Expression et localisation de CaMKII dans l'endothélium vasculaire**

L'expression des différentes isoformes de CaMKII varie considérablement selon le type cellulaire. Auparavant, CaMKII semblait être restreinte au niveau des neurones. Il est maintenant reconnu que CaMKII est exprimée sous différentes isoformes dans une variété de types cellulaires. Outre le cerveau, les tissus dans lesquels CaMKII a été identifiée seraient restreints aux isoformes  $\delta$  et  $\gamma$ . Par contre, notre étude a démontré par PCR et immunofluorescence l'expression de CaMKII $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$  dans l'endothélium d'artères fraîchement isolées. Cette découverte excitante apporte une nouveauté importante à la

communauté scientifique. En effet, ces travaux furent les premiers à montrer l'expression de CaMKII $\alpha$  et  $\beta$  en dehors du cerveau, plus précisément dans les CE vasculaires.

Le rôle et la distribution intracellulaire de CaMKII semblent dépendre de l'isoforme, puisque chacune possède des propriétés intrinsèques distinctes malgré leur grande homologie. Généralement, les différences observées entre les isoformes se situent au niveau d'une région variable entre le domaine régulateur et le domaine d'association de CaMKII. Par exemple, CaMKII $\alpha$  et  $\delta$  possèdent une séquence spécifique contenant un signal de reconnaissance nucléaire insérée dans cette région qui permet la translocation de CaMKII vers le noyau [357, 358]. CaMKII $\beta$  possède de nombreux sites d'interaction permettant la liaison spécifique des protéines du cytosquelette telles que la F-actine [353, 679]. La translocation de CaMKII est principalement régie par un signal calcique qui nécessite l'activation de l'enzyme suite à la liaison du complexe Ca<sup>2+</sup>-calmoduline. Dans les neurones la translocation de CaMKII $\alpha$  et  $\beta$  du cytosol vers les densités postsynaptiques parvient suite à une augmentation du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> dans ces régions [354]. Une stimulation des neurones engendre l'activation de CaMKII, ce qui perturbe son interaction avec la F-actine et ainsi sa translocation [354]. Nos travaux ont montré qu'une stimulation des pulsars calciques est associée à une translocation importante de CaMKII $\alpha$  et  $\beta$  dans les PME. De plus, au niveau cérébral, il est bien établi que CaMKII forme un hétéromultimère composé des isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  [348]. Shen et coll. ont montré que l'isoforme  $\beta$  associée à la F-actine peut moduler la translocation d'un hétéromultimère composé CaMKII $\alpha$  et  $\beta$  vers les sites préférentiels de CaMKII $\beta$  [353, 354]. Ainsi, la formation d'hétéromultimères entre les isoformes de CaMKII influe la localisation de l'enzyme. Des études de notre laboratoire suggèrent que la formation d'hétéromultimères entre CaMKII $\alpha/\beta$  se produit également dans les CE [680]. Cette observation coïncide parfaitement avec nos résultats montrant uniquement la présence de ces deux isoformes dans les PME. Dans les neurones, la liaison de CaMKII à différentes protéines localisées dans les densités postsynaptiques telles que les récepteurs *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA) permet la localisation en amas de CaMKII dans ces régions [353, 392]. Les sites d'interaction aux protéines présents sur CaMKII varient également entre chaque isoforme. Une étude montre que CaMKII $\beta$  possède un plus grand nombre de sites d'interaction permettant la liaison de plus de protéines que l'isoforme  $\alpha$  [353]. La régulation de l'activité de CaMKII par autophosphorylation est

également un mécanisme impliqué dans le recrutement de CaMKII. Au niveau des densités postsynaptiques, l'identification des différentes protéines pouvant lier CaMKII suite à son autophosphorylation expliquerait en partie le recrutement en amas de l'enzyme dans ces régions [681, 682]. Nos travaux suggèrent que CaMKII pourrait interagir avec NOS3 suite à une stimulation des pulsars calciques. De nombreuses études ont déjà démontré l'interaction entre ces deux protéines. Par immunofluorescence, nous avons démontré un recrutement en amas de CaMKII Thr286 dans les PMEs. La distribution en amas pourrait également être la conséquence d'une interaction entre CaMKII et NOS3 dans les PMEs suite à une stimulation des pulsars calciques.

Il existe également des différences dans l'affinité au complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline entre les isoformes de CaMKII pouvant influencer la distribution et la translocation de l'enzyme. Brocke et coll. ont démontré qu'il y avait une différence dans l'affinité à la calmoduline entre les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  de CaMKII [348]. CaMKII $\alpha$  a une affinité plus faible à la calmoduline que l'isoforme  $\beta$ , suggérant que CaMKII $\beta$  a la capacité d'atteindre une activité maximale pour une plus faible concentration de  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette différence pourrait avoir pour conséquence d'influencer la réponse de CaMKII aux différentes fréquences calciques ainsi que sa distribution intracellulaire. De plus, Bayer et coll. ont montré une différence de l'affinité à la calmoduline entre les différentes variantes de CaMKII $\beta$  [342]. Étonnamment, nous avons montré que dans l'endothélium vasculaire, CaMKII $\beta$  est exprimée sous sa variante 1 (généralement exprimée sous la forme de trois variantes). Peu d'informations sont connues sur les différences entre les variantes [342]. Toutefois, Bayer et coll. ont démontré la présence d'une plus grande affinité à la calmoduline de la variante 1 de CaMKII $\beta$  (CaMKII $\beta_M$ ) comparativement aux autres variantes. Par conséquent, l'activité autonome de CaMKII $\beta_M$  survient à de plus faibles fréquences calciques oscillatoires. Ces résultats pourraient donc suggérer un rôle particulier du variant 1 de CaMKII $\beta$  dans le CE en réponse aux pulsars calciques. Nous pouvons suggérer que dans les CEs, CaMKII $\beta$  servirait de véhicule permettant de recruter *via* les pulsars calciques l'isoforme  $\alpha$  qui est moins sensible au complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline dans les PMEs. Ainsi, CaMKII $\alpha$  pourrait effectuer son activité enzymatique spécifiquement dans les PMEs. Les pulsars calciques et toutes les signalisations calciques locales ont l'avantage de générer un effet physiologique en utilisant qu'une augmentation



locale du  $[Ca^{2+}]_i$  pouvant cibler spécifiquement les protéines impliquées dans les différents mécanismes cellulaires. L'activation et la translocation de CaMKII $\alpha$  et  $\beta$  dans les PMEs par les pulsars calciques démontrent bien le rôle de ce type de dynamique calcique, soit de cibler spécifiquement les protéines à proximité, mais aussi de les recruter au niveau des PMEs. Enfin, avec les données de la littérature qui appuient fortement, bien qu'indirectement, les étonnants résultats de nos travaux, nous pouvons suggérer que CaMKII $\beta$  en combinaison avec  $\alpha$  sont d'importants effecteurs des pulsars calciques.

La distribution intracellulaire de CaMKII est important pour la fonction de chaque isoforme [349, 351]. La translocation de CaMKII $\alpha$  et  $\delta$  vers le noyau leur confère un rôle particulier dans la transcription génique [357, 359]. La capacité unique à CaMKII $\beta$  de lier la F-actine est primordiale pour l'exécution de ses fonctions. La liaison de CaMKII $\beta$  à la F-actine stimule la formation de dendrites et augmente la densité synaptique [324, 356]. En augmentant les contacts synaptiques, CaMKII $\beta$  est importante pour la plasticité neuronale et la mémoire à long terme [379, 392]. Dans nos études, aucune évidence ne nous permet d'affirmer que CaMKII $\beta$  soit impliquée dans la formation des PMEs (en augmentant les contacts entre les CEs et les CMLVs), bien que cela puisse être une fonction intéressante pour cette enzyme. Néanmoins, CaMKII $\beta$  pourrait être impliquée dans la translocation de CaMKII $\alpha/\beta$  hétéromultimérique dans les PMEs. Ce recrutement pourrait jouer un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire sachant que CaMKII est impliquée dans la production de NO suite à une stimulation des pulsars calciques.

## **Fonction physiologique des pulsars calciques**

Depuis quelques années un nombre croissant d'études ont révélé l'importance que pourrait avoir les dynamiques calciques locales dans la régulation des fonctions endothéliales et plus particulièrement dans le contrôle du tonus vasculaire. Ledoux et coll. ont été les premiers à caractériser un signal calcique structuré et répétitif nommé pulsar calcique. Ce signal est particulièrement localisé dans les PMEs, les sites privilégiés de communications entre les CEs et les CMLVs [19]. La communication entre les deux types cellulaires a fait l'objet d'études antérieures telles que démontré entre autres par Dora et coll. [36, 38, 58] et Segal et coll. [40,

41]. Toutefois, les voies de signalisations impliquées dans cette communication restent à établir.

Les premières évidences ont montré que les pulsars calciques sont impliqués dans le mécanisme de l'EDHF en activant les canaux potassiques  $K_{Ca3.1}$ , suggérant un rôle dans le contrôle du tonus vasculaire [19]. La distribution des différentes composantes impliquées dans l'EDHF et les dynamiques calciques locales ( $IP_3Rs$ , canaux  $K_{Ca3.1}$ , TRPs et jonctions gap) est particulièrement enrichie au niveau des PMEs. Dans nos travaux, nous avons montré que les pulsars calciques ont la capacité de moduler l'activation et la translocation de CaMKII dans les PMEs. Cette nouvelle voie de signalisation implique la production de NO et conjointement au mécanisme de l'EDHF, elle pourra être impliquée dans la relaxation des CMLVs. Donc, les pulsars calciques modulent diverses voies de signalisation pouvant converger vers la régulation du tonus vasculaire. En utilisant le DAF-FM comme sonde fluorescente sensible au NO, nous avons montré qu'une stimulation spécifique des pulsars calciques avec la PE engendre une augmentation de la production de NO qui est en partie dépendante de CaMKII. En présence de KN-93 ou suite à un *knock-down* de CaMKII $\alpha/\beta$  par shRNA la production de NO est significativement diminuée. L'impact de la production de NO pulsars/CaMKII dépendante sur la réponse dilatatrice n'a toutefois pas été établi. Des difficultés liées à la méthodologie ont été rencontrées. Afin d'évaluer l'impact vasculaire de la production de NO dépendante de CaMKII, nous avons tenté des expériences au myographe pressurisé pour mesurer la contraction suite à l'application de PE (impliquant également une stimulation des pulsars calciques) et en présence de KN-93. Malheureusement, il a été impossible d'évaluer l'impact de CaMKII spécifiquement dans l'endothélium, puisque le KN-93 pouvait diffuser jusqu'au CMLVs et inhiber CaMKII. Par conséquent, nous n'avons pu établir l'effet physiologique de CaMKII suite à la stimulation des pulsars calciques. Néanmoins, les données de la littérature viennent appuyer le rôle suggéré de CaMKII endothéliale dépendante des pulsars calciques dans la réponse vasomotrice. Schneider et coll. ont démontré que la relaxation dépendante de l'endothélium en réponse à l'ACh est atténuée en présence de KN-93 [151]. Cette équipe ainsi que plusieurs autres ont clairement montré que CaMKII phosphoryle la NOS3, ce qui stimule l'activité de l'enzyme et par conséquent, la production de NO [151, 153, 421]. De plus, des expériences de co-immunoprécipitation ont révélé une association du

complexe CaMKII/NOS3 suite à une stimulation par la Bk dans les HUVECs [153]. Ces travaux appuient nos résultats mettant en évidence la relation entre CaMKII et la production de NO en réponse à une stimulation des pulsars calciques. Afin de consolider notre hypothèse, nous avons montré par immunofluorescence que NOS3 phosphorylée (pNOS3) est localisée dans les PMEs. En présence de KN-93, la densité de pNOS3 dans les PMEs est significativement diminuée. Nos résultats accompagnés des données de la littérature, suggèrent fortement une relation entre la production de NO en réponse aux pulsars calciques et CaMKII endothéliale. Ainsi, nous évoquons la possibilité que les pulsars calciques soient impliqués dans la régulation du tonus vasculaire par la stimulation de la production de NO dépendante de CaMKII endothéliale conjointement au mécanisme de l'EDHF. Cette étude propose une nouvelle voie de signalisation importante pour la fonction endothéliale impliquant les dynamiques calciques locales.

### **Stimulation des pulsars calciques en hypertension**

La première partie de nos travaux visait à étudier l'impact d'une stimulation aiguë des pulsars calciques sur CaMKII indépendamment des autres signalisations calciques endothéliales. Pour ce faire, nous avons utilisé la PE, un agoniste des récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques présents uniquement à la membrane des CMLVs. Le mécanisme sous-jacent implique une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  et de l' $\text{IP}_3$  dans les CMLVs en réponse à la PE, qui est ensuite transmise *via* les jonctions communicantes gap des PMEs aux CEs. Cette communication entre les deux types cellulaires augmente la fréquence des pulsars calciques sans modifier les autres signalisations calciques endothéliales (vague calcique ou  $\text{Ca}^{2+}$  global). L'inhibition des jonctions gap par la carbenoxolone abolit la stimulation des pulsars calciques induite par la PE. Ensuite, nous avons utilisé un modèle d'infusion chronique de PE pour induire une hypertension artérielle chez la souris préférentiellement au modèle commun utilisant l'AngII, puisqu'il ne produit pas ou très peu de ROS. Les ROS peuvent perturber les dynamiques calciques telles que les pulsars calciques et stimuler l'activité de CaMKII. L'utilisation de la PE de façon chronique nous permet d'évaluer l'impact de l'hypertension sur les pulsars calciques et CaMKII endothéliale indépendamment des ROS.

De nombreuses études ont montré une augmentation globale du  $[Ca^{2+}]_i$  endothélial ainsi que de l'amplitude de la contraction dépendante de l'endothélium dans l'aorte de rat SHR [519, 583-585]. Nos travaux effectués sur un modèle d'hypertension induite par la PE ont montré une altération des dynamiques calciques endothéliales. Nous observons une augmentation de la fréquence des pulsars calciques ainsi que du nombre de sites actifs dans les artères mésentériques de souris hypertendues. Toutefois, peu d'informations sont connues sur l'impact de l'hypertension sur les dynamiques calciques locales. Dans le chapitre 4, nous avons discuté des évidences montrant qu'une altération des mécanismes responsables du maintien de l'homéostasie calcique endothéliale pouvait être associée à la dysfonction endothéliale en hypertension. Par conséquent, l'augmentation des pulsars calciques peut être le résultat d'une altération des protéines impliquées dans la régulation des dynamiques calciques. Mountian et coll. ont démontré que l'expression de SERCA3 et d'IP<sub>3</sub>R2 est augmentée dans les CEs aortiques de rats SHR [589]. L'augmentation de SERCA3 provoquerait une augmentation de la recapture du  $Ca^{2+}$  vers les réserves intracellulaires, alors que l'augmentation d'IP<sub>3</sub>R2 stimulerait la libération du  $Ca^{2+}$  provenant du RE. Ces deux mécanismes sont complémentaires sachant que pour stimuler la libération du  $Ca^{2+}$  par les IP<sub>3</sub>Rs il est impératif pour la cellule d'adapter un mécanisme permettant la recapture du  $Ca^{2+}$  vers le RE. Étant donné que les pulsars calciques sont caractérisés par une libération de  $Ca^{2+}$  du RE par les IP<sub>3</sub>Rs, ces résultats pourraient expliquer l'augmentation de leur fréquence observée en hypertension.

D'un autre côté, une étude dans notre laboratoire a démontré que CaMKII module les pulsars calciques en agissant sur les IP<sub>3</sub>Rs [680]. Une inhibition de CaMKII avec le KN-93 augmente la fréquence globale et le nombre de sites actifs des pulsars calciques. Ces travaux ont démontré que CaMKII aurait un effet inhibiteur sur les IP<sub>3</sub>Rs, puisque son inhibition stimule la libération du  $Ca^{2+}$  par les IP<sub>3</sub>Rs. Ainsi, l'impact de CaMKII sur les pulsars calciques semblerait être un mécanisme de rétro-action négatif sur les IP<sub>3</sub>Rs. Pour appuyer ces résultats, des expériences en immunofluorescence ont révélé la distribution particulière des IP<sub>3</sub>Rs (précisément les isoformes IP<sub>3</sub>R1 et IP<sub>3</sub>R2) et de CaMKII dans les PMEs. De plus, des essais d'hybridation *in situ* PLA (*proximity ligation assay*) suggèrent une interaction entre les deux protéines. D'ailleurs, il a déjà été démontré dans les cardiomyocytes que CaMKII phosphoryle

IP<sub>3</sub>R2, diminuant ainsi la probabilité d'ouverture du canal [390]. Similairement, dans les cellules en culture de type Hela (lignée cellulaire cancéreuse), CaMKII est également associée à une inhibition des IP<sub>3</sub>Rs, empêchant ainsi la libération du Ca<sup>2+</sup> provenant du RE [415]. Dans le modèle d'hypertension induite par la PE, nous observons une diminution de l'expression de l'ARNm de CaMKIIβ. Nous ne connaissons pas l'impact de cette diminution de l'expression de CaMKIIβ, mais si cette altération résulte par une diminution de la protéine, l'augmentation des pulsars calciques observée en hypertension peut être la conséquence directe de la diminution de CaMKII. Toutefois, notre analyse semi-quantitative des expériences en immunofluorescence a montré une augmentation du recrutement de CaMKII dans les PME en hypertension. Ce résultat devrait donc avoir pour conséquence d'inhiber les pulsars calciques. L'étude effectuée sur la régulation des pulsars calciques par CaMKII évalue l'effet aigu d'une inhibition de CaMKII. Nous ne connaissons pas l'impact de l'hypertension sur cette relation. Il est possible que le mécanisme de rétro-action négatif imposé par CaMKII sur les IP<sub>3</sub>Rs soit altéré en hypertension. Selon les données de la littérature, la possibilité d'une augmentation de l'expression des IP<sub>3</sub>Rs en hypertension pourrait également justifier la stimulation des pulsars calciques. De plus, une étude a montré que l'activité enzymatique de la PLC responsable de l'augmentation du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> est augmentée dans les aortes de rats SHR (fraction enzymatique de la paroi). Ceci suggère donc qu'en hypertension la PLC pourrait stimuler les dynamiques calciques.

D'autre part, sachant que les PME sont importants pour les dynamiques calciques et la régulation du tonus vasculaire, une altération des PME pourrait également être associée à l'hypertension. Sandow et coll. ont montré que le nombre de PME est significativement plus élevé dans les SHR comparativement aux WKY [27]. Nos travaux ont également montré une augmentation des PME associées aux pulsars calciques dans les artères mésentériques de souris hypertendues. Ces résultats corrélerent avec l'augmentation de la fréquence des pulsars calciques et du nombre de sites actifs recruté en hypertension. Conjointement, la contraction des vaisseaux sanguins qui répond à une élévation de la pression artérielle (le tonus myogénique) présente une augmentation d'IP<sub>3</sub> et du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> dans les CMLVs, qui pourrait traverser vers les CE *via* les jonctions Gap localisées dans les PME et ainsi augmenter les pulsars calciques. Cette hypothèse appuie le rôle des pulsars calciques dans la régulation du

tonus vasculaire, mais propose précisément un rôle dans le mécanisme de rétroaction myoendothéliale.

### **Modulation des pulsars calciques par les espèces réactives à l'oxygène**

Dans notre première étude, nous avons établi l'impact d'une hypertension induite par une infusion chronique de PE sur les pulsars calciques et CaMKII endothéliale. Ce modèle d'hypertension est particulier puisqu'il n'induit que très peu de stress oxydant, nous permettant ainsi d'évaluer l'impact de l'augmentation de la pression intraluminale. Toutefois, de nombreuses études cliniques et fondamentales ont montré une augmentation des ROS en hypertension associée à une activation chronique du RAS. L'hypertension chez l'humain est le plus souvent associée à l'AngII compte tenu de l'importance du RAS dans la régulation de la pression artérielle. Des études cliniques ont montré qu'une inhibition du RAS ou des différentes composantes (récepteurs AT<sub>1</sub>, ACE) améliore la morbidité et la mortalité liées à l'hypertension [599, 600]. Une altération du RAS est accompagnée par une augmentation de la concentration d'AngII circulante, engendrant une augmentation de la production des ROS ainsi qu'une dysfonction endothéliale. Il a été démontré que l'expression de plusieurs sous-unités de la NADPH oxydase, la principale source de ROS dans l'endothélium, est augmentée dans le modèle d'hypertension induite par une infusion chronique d'AngII [446, 464]. Étant donné que le modèle d'hypertension à la PE ne génère que très peu de ROS, nous avons établi un modèle murin d'hypertension induite par une infusion chronique d'AngII (AngII-AH), ainsi qu'un modèle normotendu à plus faible dose d'AngII (AngII-NT). Le modèle normotendu nous a permis d'évaluer l'impact des ROS indépendamment de l'hypertension sur les pulsars calciques et CaMKII endothéliale.

À l'aide de la sonde fluorescente dihydroéthidium (DHE) sensible à l'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, nous avons montré une augmentation équivalente des ROS dans l'endothélium d'artères natives provenant des deux modèles murins d'infusion chronique à l'AngII (normo- et hypertendu). Ensuite, nous avons démontré une stimulation des pulsars calciques dans ces deux modèles. Toutefois, la fréquence globale des pulsars calciques est significativement plus élevée en AngII-AH comparativement au modèle AngII-NT, ce qui est due à une augmentation du nombre de sites actifs des pulsars calciques. Ces résultats suggèrent donc que les ROS indépendamment de

l'hypertension pourraient être impliquées dans la modulation des pulsars calciques et que l'hypertension a également un impact sur les dynamiques calciques locales indépendamment des ROS.

Les travaux réalisés suite à une stimulation aiguë à différentes concentrations d'AngII, nous ont permis de suggérer une nouvelle voie de signalisation par laquelle AngII va stimuler les dynamiques calciques dépendantes du RE dans les PMEs. Des évidences dans la littérature ont montré que l'effet de l'AngII sur les ROS ou le  $[Ca^{2+}]_i$  peut varier selon la concentration du peptide, mais également selon le type cellulaire et la condition physiopathologique. À l'aide de différentes concentrations d'AngII, nous avons pu isoler les composantes ROS et  $Ca^{2+}$  de la réponse à l'AngII. En utilisant la sonde fluorescente CM-H<sub>2</sub> DCFDA, nous avons montré qu'une faible concentration d'AngII (1 nM) ne génère pas de ROS, alors que de plus fortes concentrations (100 nM et 10  $\mu$ M) stimulent la production de ROS dans l'endothélium vasculaire. Il est intéressant de noter que nous avons montré que les pulsars calciques ne semblent pas être impliqués dans la production de ROS. D'un autre côté, toutes les concentrations d'AngII augmentent la fréquence des pulsars calciques et ceci de manière concentration-dépendante. En présence d'un antioxydant (N-acétylcystéine; NAC), la différence dans l'augmentation de la fréquence des pulsars calciques entre les plus fortes concentrations d'AngII et 1 nM d'AngII est abolie, alors qu'il n'a aucun effet sur les pulsars calciques à 1 nM d'AngII. Ces résultats suggèrent donc que les ROS sont impliqués dans la stimulation des pulsars calciques en réponse à l'AngII. De plus, des données préliminaires montrent qu'en présence d' $O_2^-$ , le  $Ca^{2+}$  global ainsi que les vagues calciques sont augmentés dans l'endothélium d'artères fraîchement isolées [683]. D'ailleurs, en présence de la SOD, la fréquence des pulsars calciques est significativement diminuée (environ 50%), alors que la catalase n'a aucun effet sur le  $Ca^{2+}$ . Ces travaux ainsi que les données sur l'AngII suggèrent fortement que les ROS peuvent moduler les pulsars calciques.

Des travaux récents de Sullivan et coll. ont révélé que les ROS dérivées de la NADPH oxydase peuvent activer les TRPA1 dans les artères cérébrales et ainsi stimuler l'influx calcique nommé TRPA1-*sparklets* [321]. Ils ont également démontré que la NADPH oxydase (NOX2 précisément) est co-localisée avec TRPA1 dans les PMEs. De plus, Zhang et coll. ont

montré que les TRPV4 endothéliaux sont également sensibles à l'état redox de la cellule [684]. Ces résultats suggèrent que les ROS endothéliaux peuvent moduler les dynamiques calciques locales. D'autre part, des études ont montré que différentes concentrations d'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peuvent moduler le [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> des CEs et des CMLVs [535-539]. Toutefois, les mécanismes par lesquels les ROS vont stimuler les dynamiques calciques locales restent à déterminer. Il a été démontré que les ROS vont induire des modifications sur les IP<sub>3</sub>Rs provoquant une augmentation de la sensibilité des récepteurs à l'IP<sub>3</sub> et par conséquent, une augmentation de la libération du Ca<sup>2+</sup> provenant des réserves intracellulaires [536, 554-556]. D'autre part, les ROS ont la capacité de stimuler la production d'IP<sub>3</sub> en réponse à un agoniste (Bk ou ATP) en modulant l'activité de la PLC ou le couplage de la PLC à la protéine G de son récepteur [541, 557, 558]. Ces évidences appuient notre hypothèse sur la possibilité d'une relation directe entre les ROS et les composantes essentielles des pulsars calciques.

Il est intéressant de noter que la stimulation aigue ou chronique des ROS et des pulsars calciques a une retombée importante sur la localisation intracellulaire de CaMKII. Une stimulation aigue à toutes les concentrations d'AngII engendre un recrutement de même niveau de CaMKII $\alpha$  et  $\beta$  dans les PMEs et ce, malgré la différence dans l'augmentation de la fréquence des pulsars calciques entre les concentrations. Ces résultats suggèrent que le recrutement de CaMKII a atteint un niveau maximal à compter d'1 nM d'AngII. À des concentrations plus élevées d'AngII, la densité de CaMKII dans les PMEs n'est donc pas sensible à l'augmentation de la fréquence des pulsars calciques par site telle qu'observée dans notre étude. Il est intéressant de noter qu'en plus du Ca<sup>2+</sup>, CaMKII peut également être modulée par le stress oxydant. L'équipe de Mark E. Anderson a démontré un nouveau mécanisme d'activation pour CaMKII impliquant l'oxydation des résidus Met281/282 (ox-CaMKII) par les ROS. Toutefois, nos travaux n'évaluent pas cette forme d'activation considérant que l'anticorps utilisé est spécifique à la forme phosphorylée en Thr286 et qu'aucune réaction croisée n'a été rapportée avec ox-CaMKII. Donc, le recrutement de CaMKII active dans les PMEs est causé principalement par l'augmentation du Ca<sup>2+</sup>.

Enfin, ces travaux sont les premières évidences démontrant qu'AngII peut moduler la libération du Ca<sup>2+</sup> *via* les IP<sub>3</sub>Rs des RE localisés dans les PMEs. Nous avons montré qu'AngII



pouvait stimuler les pulsars calciques à faible concentration et que les ROS intracellulaires pouvaient amplifier l'augmentation de la fréquence des pulsars calciques à de plus fortes concentrations d'AngII. La voie de signalisation pouvant être impliquée dans cette relation est discutée dans la section suivante.

## **Implication des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> dans la stimulation des pulsars calciques**

L'AngII va générer différentes réponses cellulaires et effets physiopathologiques dépendamment du récepteur activé (AT<sub>1</sub> ou AT<sub>2</sub>). Généralement, il est reconnu que les effets néfastes ou pathologiques d'AngII sont induits suite à l'activation des récepteurs AT<sub>1</sub>, alors que les effets protecteurs sont générés par l'activation des récepteurs AT<sub>2</sub>. La voie de signalisation du récepteur AT<sub>1</sub> implique l'activation de la PLC et de la NADPH oxydase, ce qui résulte en une augmentation du Ca<sup>2+</sup> et des ROS, respectivement. Dans les CMLVs, l'activation des récepteurs AT<sub>1</sub> engendre une vasoconstriction induite par une augmentation du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. De plus, une augmentation du stress oxydant mène à la diminution de la biodisponibilité du NO, l'associant ainsi à une dysfonction endothéliale liée à l'hypertension [133, 431, 432, 439]. L'activation des récepteurs AT<sub>2</sub> stimule la production d'agents vasodilatateurs tels que le NO, la Bk, l'acide arachidonique et ses dérivés (EETs), suggérant un rôle bénéfique à AT<sub>2</sub> contrant les effets induits par AT<sub>1</sub> en condition pathologique. Il est important de noter que les résultats sur les effets engendrés suite à une stimulation des récepteurs semblent varier selon la concentration d'AngII, le type cellulaire et la condition physiopathologique. Enfin, AngII a la capacité d'augmenter le [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> global, à ce jour, il n'y a pas encore d'évidences sur l'implication des récepteurs AT<sub>1</sub> ou AT<sub>2</sub> sur les dynamiques calciques locales telles que les pulsars calciques.

Dans nos travaux, nous avons montré que différentes concentrations d'AngII engendrent une stimulation des pulsars calciques dans les CE d'artères mésentériques. Sachant que les deux récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> sont impliqués dans la physiopathologie de l'endothélium, nous avons évalué l'impact de chacun des récepteurs sur la stimulation des pulsars calciques en utilisant leurs antagonistes respectifs, le candesartan et le PD123177. À faible concentration d'AngII, PD123177 abolit complètement la stimulation des pulsars calciques par l'AngII, alors que le

candesartan n'induit aucun effet. Ceci suggère qu'à 1 nM d'AngII, l'activation des récepteurs AT<sub>2</sub> est responsable de l'augmentation des pulsars calciques qui serait indépendante des ROS. La voie de signalisation par laquelle AngII *via* AT<sub>2</sub> pourrait stimuler les pulsars calciques reste à déterminer. Néanmoins, de nombreuses évidences ont montré que l'activation d'AT<sub>2</sub> résulte en une stimulation de la Bk et une activation de son récepteur B<sub>2</sub>. Généralement, cette voie de signalisation est étudiée pour évaluer l'impact de l'AngII sur la production de NO, qui implique également l'activation de la PKA. La stimulation de la Bk ou de son récepteur peut également engendrer l'activation de la voie de la PLC et ainsi augmenter le  $[Ca^{2+}]_i$ . Nous pouvons suggérer qu'AT<sub>2</sub> va stimuler les pulsars calciques soit par la voie de la PKA soit par celle de la PLC. La PKA est reconnue pour phosphoryler diverses protéines impliquées dans les dynamiques calciques, dont les IP<sub>3</sub>Rs, ce qui stimule leur ouverture et la PLC stimule directement la production d'IP<sub>3</sub> [217-219]. À de plus fortes concentrations d'AngII, l'inhibition de l'un ou l'autre des récepteurs diminue la stimulation des pulsars calciques de même ordre que la fréquence observée à 1 nM d'AngII. En tenant compte des données de la littérature, nous pouvons spéculer qu'à faible concentration d'AngII les récepteurs AT<sub>2</sub> des CEs seront spécifiquement stimulés, puisque leur affinité à l'AngII semble être plus élevée que celle des récepteurs AT<sub>1</sub>. Ceci pourrait également justifier qu'à 1 nM d'AngII la production de ROS n'est pas stimulée, puisque à cette concentration ce sont les récepteurs AT<sub>2</sub> qui seraient activés. De plus, nous avons démontré qu'une faible concentration d'AngII est suffisante pour stimuler la production de NO, ce qui coïncide avec les données de la littérature suggérant qu'une activation d'AT<sub>2</sub> engendre une augmentation du NO intracellulaire.

Ces résultats ne sont qu'une indication du rôle que pourrait jouer chacun des récepteurs dans la signalisation calcique locale. Ces travaux, bien qu'ils soient la première évidence d'une relation entre AngII et les pulsars calciques, ouvrent plusieurs voies à explorer, non seulement sur le rôle des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>, mais également le mécanisme par lequel les pulsars calciques sont régulés. En effet, AngII agit également sur les CMLVs, par conséquent, l'augmentation des pulsars pourrait être le résultat d'une augmentation du  $Ca^{2+}$  et d'IP<sub>3</sub> dans les CMLVs traversant vers les CEs *via* les jonctions gap des PME. Il est également connu qu'AngII peut provoquer une augmentation globale du  $[Ca^{2+}]_i$ , ce qui pourrait stimuler les pulsars calciques. De plus amples études sont nécessaires afin de comprendre l'implication et

l'impact physiopathologique de récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> sur les dynamiques calciques locales et plus particulièrement sur les pulsars calciques.

### **Impact de l'hypertension sur la voie de NO/CaMKII dépendante des pulsars calciques**

Dans nos travaux, nous révélons qu'une stimulation des pulsars calciques favorise la production de NO (stimulation aigue avec la PE). L'augmentation de la production de NO en réponse aux pulsars calciques est en partie dépendante de l'activation de CaMKII. Nous avons montré qu'en présence de KN-93 la densité de la NOS3 activée dans les PMEs est diminuée. Dans les deux modèles d'hypertension (infusion chronique de PE ou d'AngII) nous observons une augmentation importante des pulsars calciques accompagnée d'un recrutement de CaMKII dans les PMEs. Toutefois, nous ne connaissons pas l'impact de l'hypertension sur la production de NO par CaMKII. L'approche expérimentale que nous avons mise en place ne nous permet pas de comparer la production de NO entre les différents groupes (NT vs HA) puisque les sondes fluorescentes actuellement disponibles ne sont pas ratiométriques. Par conséquent, il est impossible de déterminer le niveau basal de NO, ce qui pourrait donc biaiser les données acquises ainsi que leurs conclusions. Cependant, les données de la littérature nous permettent d'émettre certaines hypothèses sur les possibilités fonctionnelles de la production de NO par CaMKII en réponse à une stimulation des pulsars calciques en hypertension.

Il est établi que le mécanisme prépondérant dans la régulation des artères de résistances telles que les artères mésentériques est celui de l'EDHF, tandis que celle des artères de plus gros calibres, comme l'aorte, la voie du NO est majoritaire. Dans les artères de résistance de différents modèles animaux d'hypertension (rats SHR ou infusion chronique d'AngII), les composantes de l'EDHF ainsi que la vasodilatation subséquente sont significativement perturbées, alors que la voie du NO n'est pas altérée [494, 685-687]. De nombreuses études suggèrent qu'il existerait un mécanisme compensatoire entre ces deux composantes pouvant ainsi améliorer la vasodilatation dépendante de l'endothélium en conditions pathologique. Ainsi, l'hypothèse émise est que l'altération de la relaxation induite par l'EDHF pourrait être compensée par une augmentation de l'importance de la voie du NO, assurant une relaxation globale adéquate des artères de résistances. Ce type de mécanisme compensatoire a été

démontré par une implication importante de la relaxation induite par l'EDHF dans des modèles d'hypertension pulmonaire, de diabète ou même encore chez des souris NOS3<sup>-/-</sup> où une perturbation de la voie du NO est observée [688-691]. Nous pouvons donc suggérer qu'en hypertension, la stimulation de la fréquence des pulsars calciques et du nombre de sites actifs serait un mécanisme compensatoire qui tente de rétablir la relaxation vasculaire en augmentant la production de NO *via* l'activation de CaMKII endothéliale. Toutefois, en hypertension la présence d'une dysfonction endothéliale est souvent caractérisée par une diminution de la biodisponibilité du NO par les ROS. D'ailleurs, l'expression et l'activation de la NADPH oxydase, la source principale de ROS, sont augmentées lors d'une dysfonction endothéliale associée à l'hypertension [112, 437, 464, 465]. Nous pouvons donc suggérer qu'une augmentation du NO par CaMKII *via* les pulsars calciques en hypertension pourrait être contrée par l'excès de ROS intracellulaires, diminuant ainsi la biodisponibilité du NO. D'autre part, la NOS3 découplée a été démontrée comme une source importante de ROS chez des patients hypertendus [451]. Il a été démontré que l'augmentation de l'expression et de l'activité de la NOS3 dans le modèle de rats SHR ne résulte pas en une augmentation du NO, mais plutôt en un excès de ROS intracellulaires [460]. Ainsi, une stimulation de la NOS3 en hypertension par CaMKII et les pulsars calciques n'engendrerait pas nécessairement une augmentation de la production de NO, mais plutôt celle du stress oxydant.

Nous avons observé que la stimulation des pulsars calciques en hypertension est accompagnée d'une augmentation de la densité de CaMKII dans les PMEs. Dans les modèles d'infusion chronique à la PE et à l'AngII, nous retrouvons une augmentation de CaMKII active ainsi que des isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  dans les PMEs. Toutefois, il est intéressant de noter que la densité de CaMKII $\beta$  uniquement se trouve plus élevée dans les PMEs des souris AngII-AH comparativement au groupe AngII-NT. Ce résultat n'a pas été observé lors d'une stimulation aigue à différentes concentrations d'AngII. Une augmentation plus élevée des pulsars calciques à de plus grandes concentrations d'AngII n'a pas été associée à une augmentation de la densité de CaMKII $\beta$  dans les PMEs. Ces observations indiquent donc que l'augmentation du recrutement de CaMKII $\beta$  dans les PMEs serait plutôt associée à un mécanisme spécifique à l'hypertension. Dans les neurones, CaMKII $\beta$  est associée à la formation d'épines dendritiques par son interaction avec le cytosquelette (F-actine). Il serait donc raisonnable de croire que

dans l'endothélium vasculaire CaMKII $\beta$  pourrait être impliquée dans la formation des PMEs sachant qu'en hypertension il y a un remodelage de la IEL et des PMEs.

Pour résumé, en condition physiologique ou lors d'une stimulation aigue des pulsars calciques et de CaMKII, la NOS3 produit principalement le NO. En hypertension, une stimulation des pulsars calciques et du recrutement de CaMKII dans les PMEs pourrait être un mécanisme compensatoire à la perte de la vasodilatation dépendante de l'EDHF en augmentant la production de NO. Toutefois, l'excès de ROS observé en hypertension pourrait diminuer la biodisponibilité du NO. D'autre part, lors d'une dysfonction endothéliale associée à l'hypertension, une activation de la NOS3 par CaMKII en réponse aux pulsars calciques pourrait engendrer la production de ROS.

### **Caractérisation des pulsars calciques dans différents lits vasculaires**

Il existe une grande hétérogénéité entre les lits vasculaires qui implique des différences dans la structure du vaisseau, mais également dans leurs propriétés intrinsèques. De nombreuses études ont démontré que la structure de la IEL, séparant les CEs des CMLVs, ainsi que les PMEs pénétrant leurs fenestrations, diffèrent selon le type et la fonction vasculaire [15, 692]. Un remodelage de la IEL est également observé dans différentes conditions telles qu'en hypertension, en présence d'un débit sanguin augmenté ou simplement durant le développement, c'est-à-dire avec l'âge [12, 15, 27, 692]. Le nombre et la taille des fenestrations de la IEL semblent augmenter dans ces situations. Ces fenestrations permettent la communication entre les CEs et les CMLVs *via* les PMEs. Jusqu'à présent les PMEs sont révélées primordiales pour la relaxation dépendante de l'EDHF. Il a été démontré que les PMEs sont absentes dans l'artère fémorale de rat ce qui concorde avec l'absence de la relaxation dépendante de l'EDHF dans ces vaisseaux [32]. Similairement à l'importance de l'EDHF, le nombre de PMEs et de fenestrations dans la IEL semblent augmenter plus le diamètre du vaisseau diminue [12, 14, 31]. De récentes évidences ont montré que les dynamiques calciques locales peuvent également varier selon le type de vaisseau. Les premières évidences d'une telle disparité ont été démontrées par les TRPs-*sparklets*, impliquant une différence dans le type de canal activé. Dans l'endothélium d'artères cérébrales les Ca<sup>2+</sup>-*sparklets* sont provoqués par l'activation des canaux TRPA1 alors que

dans les artères mésentériques l'influx calcique dépend des TRPV4. D'autres travaux de notre laboratoire ont montré que l'expression des isoformes de la PLC dans l'endothélium, ayant chacune des propriétés intrinsèques différentes, varie selon le type vasculaire, suggérant que les dynamiques calciques endothéliales peuvent également varier. Par conséquent, nous avons étudié les dynamiques calciques endothéliales dans trois lits vasculaires (artères mésentériques, coronariennes et pulmonaires) souvent associés à des pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle et pulmonaire ainsi que les maladies coronariennes.

Les travaux menés dans le cadre de cette thèse ont d'abord démontré que le nombre de fenestrations dans la IEL est significativement plus élevé dans les artères coronariennes. Ce résultat concorde avec les données sur les PMEs montrant un plus grand nombre ainsi qu'une plus grande surface couverte par les PMEs dans les artères coronariennes. Toutefois, le ratio de PMEs/fenestrations de la IEL est plus important dans les artères mésentériques, alors que les artères pulmonaires possèdent un plus faible nombre de PMEs accompagné d'un plus petit ratio d'occupation PMEs/fenestrations. Le rôle associé à cette disparité n'a pas encore été établi, mais il ne faut pas sous-estimer le faible nombre de PMEs dans les artères pulmonaires. Une étude sur un modèle computationnel suggèrent qu'un nombre élevé de PMEs n'est pas nécessaire pour obtenir un effet physiologique optimal [693]. Les résultats sur les pulsars calciques semblent montrer une certaine corrélation avec les données sur la structure de la IEL et les PMEs dans les différents vaisseaux. La fréquence globale ainsi que le nombre de sites actifs des pulsars calciques varient entre les vaisseaux. Néanmoins, l'amplitude et les paramètres cinétiques de ces dynamiques calciques locales sont similaires entre les trois types vasculaires. Ces résultats suggèrent que malgré la différence entre la structure des microdomaines, les pulsars calciques sont fondamentaux et sont fortement conservés entre les différents lits vasculaires. Les résultats obtenus dans les artères pulmonaires ont montré une corrélation entre le faible nombre de PMEs et celui du nombre de sites actifs des pulsars calciques. Les artères mésentériques et coronariennes présentent une fréquence des pulsars calciques et un nombre de sites actifs significativement plus importants, ce qui coïncide avec le nombre élevé de PMEs. Des hypothèses peuvent être émises sur les différences observées dans la structure de la IEL et des PMEs, ainsi que dans l'incidence des pulsars calciques. La

circulation coronarienne est connue pour être influencée par de fortes pressions et par la contraction ventriculaire. Par conséquent, il est important que les artères s'adaptent rapidement aux changements brusques imposés. Similairement, les artères de résistance ont pour fonction de modifier le diamètre des vaisseaux en réponse aux changements de pression. Un plus grand nombre d'opportunités pour former un contact entre les CEs et les CMLVs permettrait une meilleure communication entre ces deux types cellulaires et ainsi une fine régulation du tonus vasculaire. Au niveau des artères pulmonaires, la différence observée peut être la conséquence de notre modèle expérimental d'artères ouvertes n'impliquant pas la composante du débit sanguin qui est un important paramètre associé à l'environnement des artères pulmonaires. D'autre part, les études sur les TRPV4-*sparklets* dans les PMEs ont montré qu'une activation d'un faible nombre de canaux est suffisant pour engendrer une dilatation maximale dépendante de l'endothélium dans les artères mésentériques [228].

Dans notre première étude nous avons démontré que la structure de la IEL ainsi que celle des PMEs subit un remodelage en hypertension. Nous avons observé une augmentation de la taille des fenestrations de la IEL qui corrèle avec celle des PMEs. Le nombre plus élevé de PMEs peut également être associé à l'augmentation de la fréquence globale des pulsars calciques observée dans les deux modèles d'hypertension (PE et AngII). Cette augmentation est caractérisée par un nombre plus élevé de sites actifs des pulsars calciques. La relation entre les fenestrations de la IEL, les PMEs ainsi que l'incidence des pulsars calciques semble être conservée en condition pathologique. De nombreuses questions sur les différences dans le nombre et la taille des PMEs et des fenestrations de la IEL entre les espèces, le lit vasculaire ou même au long de l'arbre vasculaire restent à ce jour non résolues. De plus amples études permettraient d'établir une relation entre la structure et la fonction des vaisseaux.

## **Limitations**

Les projets de cette thèse ont apporté beaucoup de nouveaux concepts à la communauté scientifique. Il est important de noter que les artères utilisées pour la majorité des projets de cette thèse sont des artères mésentériques fraîchement isolées de 3<sup>ième</sup> et 4<sup>ième</sup> ordre de souris (diamètre d'environ 60 – 120  $\mu$ m). Ce modèle comporte de nombreux avantages tels que le maintien de la structure native du vaisseau (CEs, IEL, PMEs, CMLVs), ce qui est un avantage

considérable comparativement aux CE en culture. Toutefois, ce modèle possède certaines limitations méthodologiques. Malgré l'utilisation d'une technique spécifiquement mise au point pour l'isolation des CE d'artères natives [694], le rendement des CE isolées est insuffisant pour des méthodes telles que le Western Blot ou la co-immunoprécipitation, requérant une quantité élevée de tissu. Par ailleurs, l'utilisation d'artères entières nous impose la présence d'une proportion importante de CMLVs comparativement aux CE. D'autre part, l'utilisation d'artères ouvertes longitudinalement, exposant ainsi l'endothélium, ne nous permet pas de conserver ou d'imposer une pression intraluminale telle que retrouvée *in vivo*. Néanmoins, ce modèle apporte considérablement plus d'avantages que les CE en culture, puisqu'il nous a permis de mettre en évidence l'importance de la structure et de la polarité des CE, en plus de conserver l'expression physiologique des protéines.

L'identification de CaMKII $\alpha$  et  $\beta$  dans l'endothélium vasculaire, qui semblait auparavant restreinte au niveau cérébral, engendre beaucoup de questionnements quant à la fonction et la distribution de ces isoformes. Nous avons suggéré que CaMKII est impliquée dans la production du NO de façon pulsars-dépendante. L'utilisation du KN-93 et de souris *knock-down* par des shRNA contre CaMKII $\alpha/\beta$  dans les CE ont montré une diminution de la production du NO. Toutefois, nous n'avons pas démontré directement l'implication d'une activation de CaMKII *via* les pulsars calciques dans la régulation du tonus vasculaire. Nous avons déjà mentionné précédemment les tests expérimentaux en myographe pressurisé en présence de KN-93, qui malheureusement ne nous ont pas permis pas de cibler uniquement CaMKII endothéliale. Les souris *knock-down* pour CaMKII $\alpha/\beta$  permettraient d'évaluer l'impact physiologique d'une diminution de l'expression de CaMKII dans l'endothélium sur la régulation du tonus vasculaire. Par conséquent, il serait intéressant d'effectuer les études sur le myographe pressurisé en utilisant des artères de souris *knock-down* pour CaMKII $\alpha/\beta$ .

L'implication de CaMKII dans la production de NO provient du fondement d'une interaction entre cette enzyme et la NOS3 [151, 153, 421]. Toutefois, nous n'avons pas directement démontré cette interaction. Nos expériences en immunofluorescence ont montré que CaMKII et NOS3 sont localisées dans les PMEs et en présence de KN-93, le recrutement de CaMKII ainsi que l'activation de NOS3 dans les PMEs sont diminués. L'interaction entre CaMKII et



NOS3 aurait pu être démontrée par immunoprécipitation tel que démontré dans l'étude de Fleming et coll. Tel que nous l'avons mentionné précédemment, la quantité de protéines extraite suite à l'isolation des CEs d'artères natives est quantitativement insuffisante pour faire ce type d'expérience (puisque cela requerrait un trop grand nombre de tissus) [153]. Toutefois, il serait intéressant d'utiliser la technique d'hybridation *in situ* PLA, utilisée dans d'autres projets de notre équipe, afin de mettre en lumière une éventuelle interaction entre CaMKII et la NOS3 dans les PME. Enfin, l'identification par Western Blot de CaMKII et de ses isoformes dans l'endothélium vasculaire a été un défi que nous avons relevé que partiellement. L'expression protéique de CaMKII dans les CEs natives isolées n'a pu être quantifiée afin d'évaluer l'impact de la diminution de l'expression de l'ARNm de CaMKII $\beta$  en hypertension.

L'utilisation de la PE pour stimuler spécifiquement les pulsars calciques n'est pas un composé physiologique. Le modèle d'hypertension induite par une infusion chronique de PE ne montre que très peu de stress oxydant. Toutefois, l'hypertension est souvent associée à une augmentation des ROS associée à une dysfonction endothéliale. Les expériences avec AngII nous ont permis d'évaluer le potentiel physiopathologique de la nouvelle voie de signalisation suggérée impliquant CaMKII et les pulsars calciques. D'autre part, l'utilisation de l'AngII ne nous permet pas d'évaluer le mécanisme par lequel AngII va stimuler les pulsars calciques. Une stimulation à l'AngII va également engendrer une augmentation des autres dynamiques calciques locales telles que les TRPV4-*sparklets* ainsi que du  $[Ca^{2+}]_i$  global. Avec les données de la littérature, nous pouvons suggérer que de fortes concentrations d'AngII activent les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> pour stimuler la fréquence globale des pulsars calciques. En présence d'une concentration élevée en AngII, le  $[Ca^{2+}]_i$ , l'IP<sub>3</sub> et les ROS sont augmentés dans les CEs et les CMLVs et par conséquent peuvent stimuler les pulsars calciques. À l'opposé, une faible concentration d'AngII semble stimuler préférentiellement les récepteurs AT<sub>2</sub>, qui provoquent également une augmentation de la fréquence globale des pulsars calciques. Nos travaux ne permettent pas d'établir la voie de signalisation impliquée dans ce mécanisme. Toutefois, avec les données de la littérature nous pouvons suggérer que la PKA, la Bk et son récepteur B<sub>2</sub> peuvent jouer un rôle important dans la stimulation du  $[Ca^{2+}]_i$ . Évidemment de plus amples études seront nécessaires afin de comprendre le mécanisme par lequel AngII stimule les pulsars calciques et l'impact physiopathologique d'une telle stimulation.

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

## Conclusions et perspectives

Collectivement, les travaux présentés dans cette thèse ont permis l'identification d'une nouvelle voie de signalisation impliquant l'activation de CaMKII endothéliale par les pulsars calciques (Figure 21, page 246). D'une part, l'identification des isoformes de CaMKII ( $\alpha$  et  $\beta$ ) comme effecteurs des pulsars calciques dans l'endothélium d'artères natives a permis de contribuer à la compréhension des mécanismes régulateurs de l'enzyme. D'autre part, la caractérisation des pulsars calciques en conditions physiopathologiques a permis d'élargir nos connaissances sur l'implication des dynamiques calciques locales dans la fonction vasculaire. Leur présence fortement conservée entre différents lits vasculaires suggère que les pulsars calciques font partie intégrante des artères de résistance et pourraient jouer un rôle important dans la fonction vasculaire.

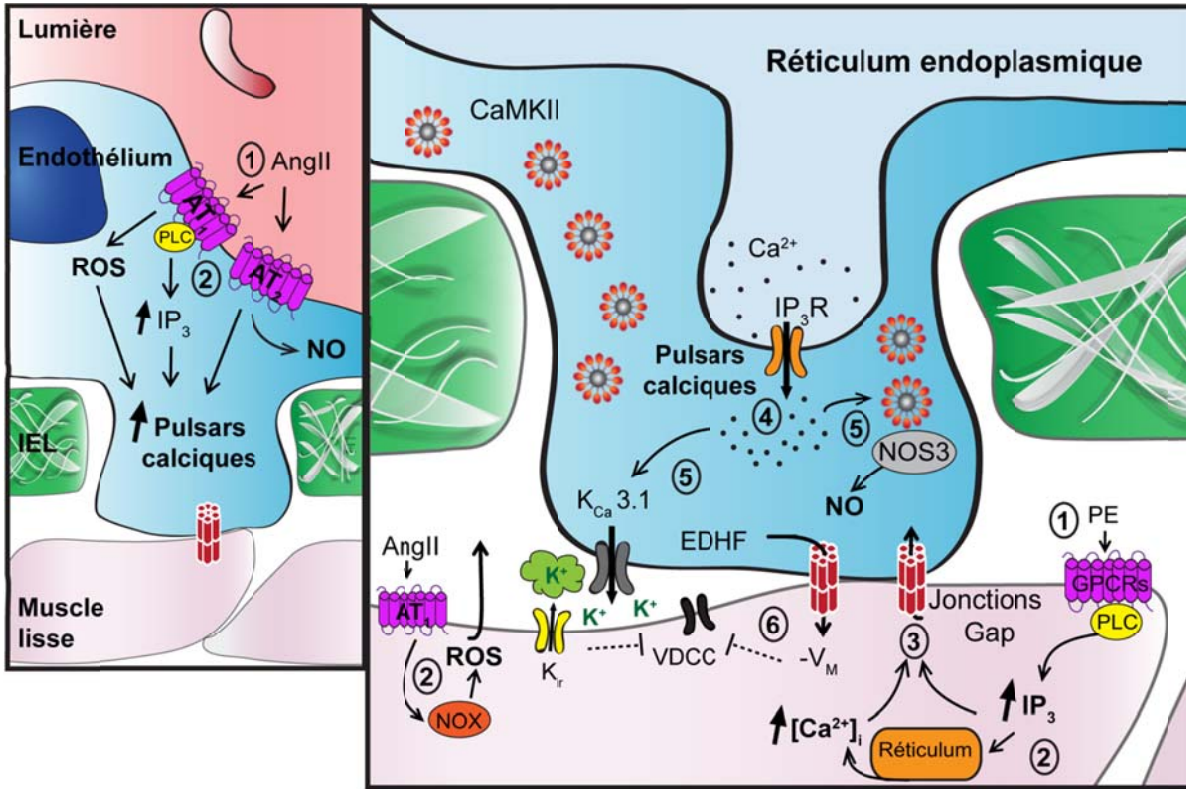
L'originalité de nos travaux réside entre autres dans le modèle choisi d'artères natives de souris qui permet de conserver les microdomaines formés par les PMEs et ainsi, préserver la communication entre les CEs et les CMLVs. L'utilisation de ce modèle d'artères intactes augmente la pertinence fonctionnelle de nos résultats. Les évidences relevées par nos travaux suggèrent que la voie de signalisation pulsars/CaMKII pourrait être impliquée dans la modulation du tonus vasculaire *via* la production de NO. En effet, nous avons identifié la NOS3 comme cible potentielle de CaMKII dans les PMEs. De plus, une perturbation de certaines composantes de cette voie de signalisation est observée dans la pathologie de l'hypertension artérielle. Outre l'étude de Sonkusare et coll., révélant une altération des TRPV4-*sparklets* dans l'endothélium vasculaire en hypertension, peu d'informations sont connues sur les dynamiques calciques locales endothéliales en condition pathologique [228]. Il est bien établi que le  $\text{Ca}^{2+}$  est un élément essentiel aux diverses fonctions endothéliales et la signalisation calcique locale possède de nombreux avantages pour la régulation de ces fonctions. Un signal calcique localisé permet une économie d'énergie en ciblant les protéines d'intérêts situées à proximité sans affecter l'ensemble des mécanismes cellulaires sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$ . Par conséquent, une perturbation des cinétiques des pulsars calciques peut être associée à une dysfonction endothéliale en hypertension. Cette dysfonction endothéliale est généralement caractérisée par une diminution de la biodisponibilité du NO ainsi qu'une augmentation du

stress oxydant. Nos travaux ont révélé un mécanisme important pouvant être impliqué dans cette pathologie. La voie de signalisation suggérée représente une avenue intéressante pour des cibles thérapeutiques potentielles pour contrer la dysfonction endothéliale observée en hypertension. De plus amples études seront nécessaires afin d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes physiologiques impliqués dans la régulation des dynamiques calciques endothéliales.

Nous avons précédemment discuté des expériences complémentaires qui permettraient de répondre à certaines hypothèses émises sur le fondement de nos résultats. Des études fonctionnelles à l'aide du myographe pressurisé sur des artères de souris *knock-down* pour CaMKII $\alpha/\beta$  pourraient démontrer directement l'impact physiopathologique de la voie de signalisation pulsars/CaMKII/NOS3 proposée par cette thèse. Ces travaux appuieraient nos résultats ainsi que nos hypothèses. Les évidences montrant l'importance des dynamiques calciques locales endothéliales dans la fonction endothéliale méritent d'être approfondies. Nos résultats proposent qu'en hypertension la relation entre les pulsars calciques et CaMKII est perturbée. Par conséquent, la caractérisation de cette nouvelle voie de signalisation permettrait le développement de nouvelles cibles thérapeutiques associées à la dysfonction endothéliale observée dans diverses pathologies vasculaires. Dans l'article 3, le modèle d'hypertension à l'AngII est caractérisé par une augmentation des ROS et des pulsars calciques. Toutefois, le mécanisme impliqué dans cette altération n'a pas été démontré. Il serait intéressant d'étudier plus précisément l'impact des ROS sur les pulsars calciques et les conséquences sur la fonction endothéliale. Des données préliminaires montrent que l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> est la principale source d'augmentation du Ca<sup>2+</sup> global et des oscillations calciques. Néanmoins, la source de ROS impliquée dans l'altération des dynamiques calciques observée dans le modèle d'infusion chronique à l'AngII n'a pas été établie. La caractérisation des récepteurs à l'AngII impliqués dans l'hypertension induite par l'AngII permettrait une meilleure compréhension du mécanisme concerné. Sachant qu'AT<sub>1</sub> est généralement responsable de l'augmentation des ROS *via* la NADPH oxydase, une infusion chronique de son bloqueur, le candesartan, permettrait d'étudier l'impact sur la production des ROS, mais également sur les pulsars calciques. De telles expériences peuvent également être conçues pour explorer l'impact des récepteurs AT<sub>2</sub> en utilisant le PD123177. D'autre part, sachant que CaMKII est sensible au

stress oxydant, il serait intéressant d'évaluer ce mécanisme d'activation de CaMKII par les ROS dans notre modèle expérimental d'artères natives. Ainsi, étudier ce nouveau mécanisme d'activation permettrait d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes régulateurs de CaMKII. D'ailleurs, l'équipe de Mark E. Anderson a commercialisé un anticorps contre CaMKII Met281/282, qui pourrait être utilisé pour des études en immunofluorescence afin de démontrer la localisation et la translocation de cette forme de CaMKII dans les PMEs.

Pour conclure, nos travaux sont innovateurs, car ils proposent une nouvelle voie de signalisation impliquant les dynamiques calciques locales (pulsars calciques) et CaMKII endothéliale (isoformes  $\alpha$  et  $\beta$ ). Ayant déterminé que les pulsars calciques sont fortement conservés entre les différents lits vasculaires, un rôle prépondérant se voit attribué aux pulsars calciques dans la régulation de la fonction vasculaire, plus particulièrement dans le tonus vasculaire. Sur le fondement de nos résultats, nous avons également proposé de nouvelles hypothèses telles qu'un rôle pour la NOS3 dans la production de NO *via* l'activation de CaMKII par les pulsars calciques. Cette voie de signalisation localisée dans les PMEs permettrait un rendement plus efficace du NO produit grâce à la proximité des CMLVs. D'autre part, nous suggérons un rôle différentiel entre les deux récepteurs à l'AngII (AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>) dans la modulation de pulsars calciques en conditions physiopathologiques. Nos travaux ont grandement contribué à l'amélioration des connaissances sur les dynamiques calciques endothéliales, ainsi que l'occurrence d'une dyshoméostasie calcique en condition pathologique. Enfin, de plus amples études permettent de consolider nos résultats et nos hypothèses et conséquemment, mener au développement de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de contrer la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension artérielle.



**Figure 21. Schéma des voies de signalisation des pulsars calciques.**

(1) Au niveau des CMLVs, la PE et l'AngII activent les GPCRs : les récepteurs  $\alpha_1$ -adr et AT<sub>1</sub> respectivement. (2) L'activation de ces récepteurs induit une augmentation des ROS ainsi que d'IP<sub>3</sub> et du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (3) pouvant traverser la IEL et les jonctions Gap respectivement, (4) afin de stimuler les pulsars calciques. (1) Au niveau des CEs, AngII active les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>, (2) ce qui stimule la production de ROS et les pulsars calciques. Au niveau des PMEs, la stimulation des pulsars calciques (5) active les canaux KCa<sub>3.1</sub> (6) provoquant une hyperpolarisation de la membrane des CEs qui est transmise aux CMLVs *via* les jonctions Gap ainsi qu'un efflux de K<sup>+</sup> qui génère un nuage potassique dans l'espace myoendothéliale ce qui active les canaux K<sub>ir</sub>. L'hyperpolarisation des CMLVs inhibe les canaux VDCC. Conjointement, (5) les pulsars calciques engendrent un recrutement de CaMKIIα et β dans les PMEs. (6) L'activation de CaMKII par les pulsars calciques stimule la production de NO par la NOS3.

$\alpha_1$ -adr : récepteurs  $\alpha_1$ -adrénergiques, AngII : angiotensine II, AT<sub>1</sub>/AT<sub>2</sub> : récepteurs à l'AngII, Ca<sup>2+</sup> : calcium, CaMKII : Kinase II dépendante du complexe Ca<sup>2+</sup>-calmoduline, CEs : cellules endothéliales, CMLVs : cellules musculaires lisses vasculaires, EDHF : facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium, GPCRs : récepteurs couplés aux protéines G, IEL : lamina élastique interne, IP<sub>3</sub>R : récepteur à l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>), K<sup>+</sup> : potassium, KCa<sub>3.1</sub> : canaux potassiques de moyenne conductance dépendant du Ca<sup>2+</sup>, K<sub>ir</sub> : canaux potassiques à rectification entrante, NOX : NADPH oxydase, PE : phényléphrine, PLC : phospholipase C, PMEs : projections myoendothéliales, ROS : espèces réactives à l'oxygène, VDCC : canaux calciques dépendants du voltage, -V<sub>M</sub> : hyperpolarisation.

## Références

1. Galley, H.F. and N.R. Webster, *Physiology of the endothelium*. Br J Anaesth, 2004. **93**(1): p. 105-13.
2. Sandoo, A., et al., *The endothelium and its role in regulating vascular tone*. Open Cardiovasc Med J, 2010. **4**: p. 302-12.
3. Florey, *The endothelial cell*. Br Med J, 1966. **2**(5512): p. 487-90.
4. SoRelle, R., *Nobel prize awarded to scientists for nitric oxide discoveries*. Circulation, 1998. **98**(22): p. 2365-6.
5. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
6. Mulvany, M.J. and C. Aalkjaer, *Structure and function of small arteries*. Physiol Rev, 1990. **70**(4): p. 921-61.
7. Bazzoni, G. and E. Dejana, *Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis*. Physiol Rev, 2004. **84**(3): p. 869-901.
8. Dejana, E., E. Tournier-Lasserre, and B.M. Weinstein, *The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications*. Dev Cell, 2009. **16**(2): p. 209-21.
9. Fischer, C., M. Schneider, and P. Carmeliet, *Principles and therapeutic implications of angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis*. Handb Exp Pharmacol, 2006(176 Pt 2): p. 157-212.
10. Deanfield, J.E., J.P. Halcox, and T.J. Rabelink, *Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance*. Circulation, 2007. **115**(10): p. 1285-95.
11. Cines, D.B., et al., *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3527-61.
12. Sandow, S.L., D.J. Gzik, and R.M. Lee, *Arterial internal elastic lamina holes: relationship to function?* J Anat, 2009. **214**(2): p. 258-66.
13. Aiello, V.D., et al., *Morphology of the internal elastic lamina in arteries from pulmonary hypertensive patients: a confocal laser microscopy study*. Mod Pathol, 2003. **16**(5): p. 411-6.

14. Lee, R.M., *Morphology of cerebral arteries*. Pharmacol Ther, 1995. **66**(1): p. 149-73.
15. Wong, L.C. and B.L. Langille, *Developmental remodeling of the internal elastic lamina of rabbit arteries: effect of blood flow*. Circ Res, 1996. **78**(5): p. 799-805.
16. Kirby, B.S., et al., *Robust internal elastic lamina fenestration in skeletal muscle arteries*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54849.
17. Sims, F.H., *The internal elastic lamina in normal and abnormal human arteries. A barrier to the diffusion of macromolecules from the lumen*. Artery, 1989. **16**(3): p. 159-73.
18. Masuda, H., et al., *Adaptive remodeling of internal elastic lamina and endothelial lining during flow-induced arterial enlargement*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(10): p. 2298-307.
19. Ledoux, J., et al., *Functional architecture of inositol 1,4,5-trisphosphate signaling in restricted spaces of myoendothelial projections*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(28): p. 9627-32.
20. Guo, Z.Y., et al., *Flow shear stress affects macromolecular accumulation through modulation of internal elastic lamina fenestrae*. Clin Biomech (Bristol, Avon), 2008. **23 Suppl 1**: p. S104-11.
21. Davis, M.J. and M.A. Hill, *Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response*. Physiol Rev, 1999. **79**(2): p. 387-423.
22. Davis, M.J., *Myogenic response gradient in an arteriolar network*. Am J Physiol, 1993. **264**(6 Pt 2): p. H2168-79.
23. Uchida, E. and D.F. Bohr, *Myogenic tone in isolated perfused vessels. Occurrence among vascular beds and along vascular trees*. Circ Res, 1969. **25**(5): p. 549-55.
24. Ledoux, J., et al., *Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone*. Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 69-78.
25. Knot, H.J. and M.T. Nelson, *Regulation of arterial diameter and wall [Ca<sup>2+</sup>] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure*. J Physiol, 1998. **508 ( Pt 1)**: p. 199-209.
26. Nelson, M.T., et al., *Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks*. Science, 1995. **270**(5236): p. 633-7.



27. Sandow, S.L., et al., *Structure, function, and endothelium-derived hyperpolarizing factor in the caudal artery of the SHR and WKY rat*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(5): p. 822-8.
28. Sandow, S.L. and C.E. Hill, *Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses*. Circ Res, 2000. **86**(3): p. 341-6.
29. Tran, C.H., et al., *Endothelial Ca<sup>2+</sup> wavelets and the induction of myoendothelial feedback*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(8): p. C1226-42.
30. Sandow, S.L., et al., *What's where and why at a vascular myoendothelial microdomain signalling complex*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2009. **36**(1): p. 67-76.
31. Heberlein, K.R., A.C. Straub, and B.E. Isakson, *The myoendothelial junction: breaking through the matrix?* Microcirculation, 2009. **16**(4): p. 307-22.
32. Hill, C.E., et al., *Heterogeneity in the distribution of vascular gap junctions and connexins: implications for function*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2002. **29**(7): p. 620-5.
33. Billaud, M., et al., *Regulation of cellular communication by signaling microdomains in the blood vessel wall*. Pharmacol Rev, 2014. **66**(2): p. 513-69.
34. Kansui, Y., C.J. Garland, and K.A. Dora, *Enhanced spontaneous Ca<sup>2+</sup> events in endothelial cells reflect signalling through myoendothelial gap junctions in pressurized mesenteric arteries*. Cell Calcium, 2008. **44**(2): p. 135-46.
35. Isakson, B.E., S.I. Ramos, and B.R. Duling, *Ca<sup>2+</sup> and inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated signaling across the myoendothelial junction*. Circ Res, 2007. **100**(2): p. 246-54.
36. Dora, K.A., et al., *Myoendothelial gap junctions may provide the pathway for EDHF in mouse mesenteric artery*. J Vasc Res, 2003. **40**(5): p. 480-90.
37. Lambole, M., et al., *Evidence for signaling via gap junctions from smooth muscle to endothelial cells in rat mesenteric arteries: possible implication of a second messenger*. Cell Calcium, 2005. **37**(4): p. 311-20.
38. Dora, K.A., M.P. Doyle, and B.R. Duling, *Elevation of intracellular calcium in smooth muscle causes endothelial cell generation of NO in arterioles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(12): p. 6529-34.

39. Tran, C.H., D.T. Kurjiaka, and D.G. Welsh, *Emerging trend in second messenger communication and myoendothelial feedback*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 243.
40. Segal, S.S. and B.R. Duling, *Communication between feed arteries and microvessels in hamster striated muscle: segmental vascular responses are functionally coordinated*. Circ Res, 1986. **59**(3): p. 283-90.
41. Welsh, D.G. and S.S. Segal, *Endothelial and smooth muscle cell conduction in arterioles controlling blood flow*. Am J Physiol, 1998. **274**(1 Pt 2): p. H178-86.
42. Sonkusare, S.K., et al., *Elementary Ca<sup>2+</sup> signals through endothelial TRPV4 channels regulate vascular function*. Science, 2012. **336**(6081): p. 597-601.
43. Straub, A.C., A.C. Zeigler, and B.E. Isakson, *The myoendothelial junction: connections that deliver the message*. Physiology (Bethesda), 2014. **29**(4): p. 242-9.
44. Haddock, R.E., et al., *Endothelial coordination of cerebral vasomotion via myoendothelial gap junctions containing connexins 37 and 40*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(5): p. H2047-56.
45. Isakson, B.E., A.K. Best, and B.R. Duling, *Incidence of protein on actin bridges between endothelium and smooth muscle in arterioles demonstrates heterogeneous connexin expression and phosphorylation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(6): p. H2898-904.
46. Sandow, S.L., et al., *Spatial separation of endothelial small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels (K(Ca)) and connexins: possible relationship to vasodilator function?* J Anat, 2006. **209**(5): p. 689-98.
47. Isakson, B.E., *Localized expression of an Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> receptor at the myoendothelial junction selectively regulates heterocellular Ca<sup>2+</sup> communication*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 21): p. 3664-73.
48. Senadheera, S., et al., *Transient receptor potential canonical type 3 channels facilitate endothelium-derived hyperpolarization-mediated resistance artery vasodilator activity*. Cardiovasc Res, 2012. **95**(4): p. 439-47.
49. Straub, A.C., et al., *Compartmentalized connexin 43 s-nitrosylation/denitrosylation regulates heterocellular communication in the vessel wall*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(2): p. 399-407.

50. Fleming, I., B. Fisslthaler, and R. Busse, *Calcium signaling in endothelial cells involves activation of tyrosine kinases and leads to activation of mitogen-activated protein kinases*. Circ Res, 1995. **76**(4): p. 522-9.
51. Socha, M.J., et al., *Coordination of intercellular Ca(2+) signaling in endothelial cell tubes of mouse resistance arteries*. Microcirculation, 2012. **19**(8): p. 757-70.
52. Verhamme, P. and M.F. Hoylaerts, *The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis*. Acta Clin Belg, 2006. **61**(5): p. 213-9.
53. Michiels, C., *Endothelial cell functions*. J Cell Physiol, 2003. **196**(3): p. 430-43.
54. Pearson, J.D., *Endothelial cell function and thrombosis*. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol, 1999. **12**(3): p. 329-41.
55. Shimokawa, H., et al., *The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation*. J Cardiovasc Pharmacol, 1996. **28**(5): p. 703-11.
56. Bredt, D.S. and S.H. Snyder, *Nitric oxide: a physiologic messenger molecule*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 175-95.
57. Fleming, I. and R. Busse, *Signal transduction of eNOS activation*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(3): p. 532-41.
58. Dora, K.A., et al., *An indirect influence of phenylephrine on the release of endothelium-derived vasodilators in rat small mesenteric artery*. Br J Pharmacol, 2000. **129**(2): p. 381-7.
59. Fleming, I., et al., *Isometric contraction induces the Ca<sup>2+</sup>-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(3): p. 1123-8.
60. Denninger, J.W. and M.A. Marletta, *Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1411**(2-3): p. 334-50.
61. Carvajal, J.A., et al., *Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation*. J Cell Physiol, 2000. **184**(3): p. 409-20.
62. Lincoln, T.M., N. Dey, and H. Sellak, *Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression*. J Appl Physiol (1985), 2001. **91**(3): p. 1421-30.

63. Xiong, Z. and N. Sperelakis, *Regulation of L-type calcium channels of vascular smooth muscle cells*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(1): p. 75-91.
64. Looft-Wilson, R.C., et al., *Interaction between nitric oxide signaling and gap junctions: effects on vascular function*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1818**(8): p. 1895-902.
65. Pfenniger, A., et al., *Gap junction protein Cx37 interacts with endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(4): p. 827-34.
66. Alonso, F., et al., *Loss of connexin40 is associated with decreased endothelium-dependent relaxations and eNOS levels in the mouse aorta*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **299**(5): p. H1365-73.
67. Schini-Kerth, V.B., *Vascular biosynthesis of nitric oxide: effect on hemostasis and fibrinolysis*. Transfus Clin Biol, 1999. **6**(6): p. 355-63.
68. Chataigneau, T., et al., *Acetylcholine-induced relaxation in blood vessels from endothelial nitric oxide synthase knockout mice*. Br J Pharmacol, 1999. **126**(1): p. 219-26.
69. Sun, D., et al., *Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced arteriolar dilation in eNOS knockout mice*. Circ Res, 1999. **85**(3): p. 288-93.
70. Yamaki, F., et al., *MaxiK channel-mediated relaxation of guinea-pig aorta following stimulation of IP receptor with beraprost via cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2001. **364**(6): p. 538-50.
71. Tanaka, Y., et al., *New insights into the intracellular mechanisms by which PGI<sub>2</sub> analogues elicit vascular relaxation: cyclic AMP-independent, Gs-protein mediated-activation of MaxiK channel*. Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents, 2004. **2**(3): p. 257-65.
72. Nagao, T. and P.M. Vanhoutte, *Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery*. J Physiol, 1992. **445**: p. 355-67.
73. Garland, C.J. and G.A. McPherson, *Evidence that nitric oxide does not mediate the hyperpolarization and relaxation to acetylcholine in the rat small mesenteric artery*. Br J Pharmacol, 1992. **105**(2): p. 429-35.

74. Luksha, L., S. Agewall, and K. Kublickiene, *Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease*. Atherosclerosis, 2009. **202**(2): p. 330-44.
75. Ozkor, M.A. and A.A. Quyyumi, *Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular function*. Cardiol Res Pract, 2011. **2011**: p. 156146.
76. Griffith, T.M., *Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis?* Br J Pharmacol, 2004. **141**(6): p. 881-903.
77. Edwards, G., et al., *Role of gap junctions in the responses to EDHF in rat and guinea-pig small arteries*. Br J Pharmacol, 1999. **128**(8): p. 1788-94.
78. Figueroa, X.F., et al., *Central role of connexin40 in the propagation of electrically activated vasodilation in mouse cremasteric arterioles in vivo*. Circ Res, 2003. **92**(7): p. 793-800.
79. de Wit, C., et al., *Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice*. Circ Res, 2000. **86**(6): p. 649-55.
80. Urakami-Harasawa, L., et al., *Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries*. J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2793-9.
81. Tomioka, H., et al., *Relaxation in different-sized rat blood vessels mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor: importance of processes mediating precontractions*. J Vasc Res, 1999. **36**(4): p. 311-20.
82. Kohler, R. and J. Hoyer, *The endothelium-derived hyperpolarizing factor: insights from genetic animal models*. Kidney Int, 2007. **72**(2): p. 145-50.
83. Edwards, G., et al., *K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries*. Nature, 1998. **396**(6708): p. 269-72.
84. Ledoux, J., A.D. Bonev, and M.T. Nelson, *Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in murine endothelial cells: block by intracellular calcium and magnesium*. J Gen Physiol, 2008. **131**(2): p. 125-35.
85. Ungvari, Z., A. Csizsar, and A. Koller, *Increases in endothelial Ca(2+) activate K(Ca) channels and elicit EDHF-type arteriolar dilation via gap junctions*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(5): p. H1760-7.
86. Nelson, M.T., et al., *Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone*. Am J Physiol, 1990. **259**(1 Pt 1): p. C3-18.

87. Nelson, M.T. and J.M. Quayle, *Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle*. Am J Physiol, 1995. **268**(4 Pt 1): p. C799-822.
88. Prior, H.M., et al., *K(+)-induced dilation of a small renal artery: no role for inward rectifier K<sup>+</sup> channels*. Cardiovasc Res, 1998. **37**(3): p. 780-90.
89. Ellinsworth, D.C., et al., *Endothelial control of vasodilation: integration of myoendothelial microdomain signalling and modulation by epoxyeicosatrienoic acids*. Pflugers Arch, 2014. **466**(3): p. 389-405.
90. Busse, R., et al., *EDHF: bringing the concepts together*. Trends Pharmacol Sci, 2002. **23**(8): p. 374-80.
91. Campbell, W.B., et al., *Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors*. Circ Res, 1996. **78**(3): p. 415-23.
92. Earley, S., et al., *TRPV4 forms a novel Ca<sup>2+</sup> signaling complex with ryanodine receptors and BKCa channels*. Circ Res, 2005. **97**(12): p. 1270-9.
93. Earley, S., et al., *TRPV4-dependent dilation of peripheral resistance arteries influences arterial pressure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(3): p. H1096-102.
94. Popp, R., et al., *Dynamic modulation of interendothelial gap junctional communication by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid*. Circ Res, 2002. **90**(7): p. 800-6.
95. Weston, A.H., et al., *Bradykinin-induced, endothelium-dependent responses in porcine coronary arteries: involvement of potassium channel activation and epoxyeicosatrienoic acids*. Br J Pharmacol, 2005. **145**(6): p. 775-84.
96. Watanabe, H., et al., *Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels*. Nature, 2003. **424**(6947): p. 434-8.
97. Earley, S., A.L. Gonzales, and R. Crnich, *Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> channels*. Circ Res, 2009. **104**(8): p. 987-94.
98. Marrelli, S.P., et al., *PLA2 and TRPV4 channels regulate endothelial calcium in cerebral arteries*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(3): p. H1390-7.
99. Zhang, D.X., et al., *Transient receptor potential vanilloid type 4-deficient mice exhibit impaired endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine in vitro and in vivo*. Hypertension, 2009. **53**(3): p. 532-8.

100. Feletou, M., in *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*. 2011: San Rafael (CA).
101. Vanhoutte, P.M. and C.M. Boulanger, *Endothelium-dependent responses in hypertension*. *Hypertens Res*, 1995. **18**(2): p. 87-98.
102. Vanhoutte, P.M., M. Feletou, and S. Taddei, *Endothelium-dependent contractions in hypertension*. *Br J Pharmacol*, 2005. **144**(4): p. 449-58.
103. Luscher, T.F. and P.M. Vanhoutte, *Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat*. *Hypertension*, 1986. **8**(4): p. 344-8.
104. Yang, D., et al., *A diffusible substance(s) mediates endothelium-dependent contractions in the aorta of SHR*. *Hypertension*, 2003. **41**(1): p. 143-8.
105. Narumiya, S., Y. Sugimoto, and F. Ushikubi, *Prostanoid receptors: structures, properties, and functions*. *Physiol Rev*, 1999. **79**(4): p. 1193-226.
106. De Mey, J.G. and P.M. Vanhoutte, *Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium*. *Circ Res*, 1982. **51**(4): p. 439-47.
107. Funk, C.D., *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. *Science*, 2001. **294**(5548): p. 1871-5.
108. Thorin, E. and M. Clozel, *The cardiovascular physiology and pharmacology of endothelin-1*. *Adv Pharmacol*, 2010. **60**: p. 1-26.
109. Hsieh, H.J., et al., *Increase of reactive oxygen species (ROS) in endothelial cells by shear flow and involvement of ROS in shear-induced c-fos expression*. *J Cell Physiol*, 1998. **175**(2): p. 156-62.
110. Abid, M.R., et al., *NADPH oxidase activity is required for endothelial cell proliferation and migration*. *FEBS Lett*, 2000. **486**(3): p. 252-6.
111. Li, J.M. and A.M. Shah, *Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004. **287**(5): p. R1014-30.
112. Landmesser, U. and D.G. Harrison, *Oxidative stress and vascular damage in hypertension*. *Coron Artery Dis*, 2001. **12**(6): p. 455-61.

113. Suzuki, Y.J. and G.D. Ford, *Inhibition of Ca(2+)-ATPase of vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum by reactive oxygen intermediates*. Am J Physiol, 1991. **261**(2 Pt 2): p. H568-74.
114. Scherer, N.M. and D.W. Deamer, *Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryl groups in the Ca2+-ATPase*. Arch Biochem Biophys, 1986. **246**(2): p. 589-601.
115. Suzuki, Y.J. and G.D. Ford, *Superoxide stimulates IP3-induced Ca2+ release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum*. Am J Physiol, 1992. **262**(1 Pt 2): p. H114-6.
116. Kaneko, M., R.E. Beamish, and N.S. Dhalla, *Depression of heart sarcolemmal Ca2+-pump activity by oxygen free radicals*. Am J Physiol, 1989. **256**(2 Pt 2): p. H368-74.
117. Kourie, J.I., *Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms*. Am J Physiol, 1998. **275**(1 Pt 1): p. C1-24.
118. Yan, Y., et al., *Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling*. Acta Pharmacol Sin, 2006. **27**(7): p. 821-6.
119. Drouin, A. and E. Thorin, *Flow-induced dilation is mediated by Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide in mouse cerebral arteries*. Stroke, 2009. **40**(5): p. 1827-33.
120. Drouin, A., et al., *Endothelial nitric oxide synthase activation leads to dilatory H2O2 production in mouse cerebral arteries*. Cardiovasc Res, 2007. **73**(1): p. 73-81.
121. Fujimoto, S., et al., *Mechanisms of hydrogen peroxide-induced relaxation in rabbit mesenteric small artery*. Eur J Pharmacol, 2001. **412**(3): p. 291-300.
122. Hayabuchi, Y., et al., *Hydrogen peroxide-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca2+-activated K+ channels*. Heart Vessels, 1998. **13**(1): p. 9-17.
123. Matoba, T., et al., *Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **290**(3): p. 909-13.
124. Muller, D.N., et al., *Vascular angiotensin-converting enzyme expression regulates local angiotensin II*. Hypertension, 1997. **29**(1 Pt 1): p. 98-104.



125. Gao, Y.J. and R.M. Lee, *Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A<sub>2</sub> production*. Br J Pharmacol, 2001. **134**(8): p. 1639-46.
126. Garcia-Redondo, A.B., et al., *Hypertension increases contractile responses to hydrogen peroxide in resistance arteries through increased thromboxane A<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup>, and superoxide anion levels*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **328**(1): p. 19-27.
127. Katusic, Z.S. and P.M. Vanhoutte, *Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor*. Am J Physiol, 1989. **257**(1 Pt 2): p. H33-7.
128. van Kats, J.P., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade prevent cardiac remodeling in pigs after myocardial infarction: role of tissue angiotensin II*. Circulation, 2000. **102**(13): p. 1556-63.
129. Liu, Y.H., et al., *Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. Role of kinins and angiotensin II type 2 receptors*. J Clin Invest, 1997. **99**(8): p. 1926-35.
130. Faria-Costa, G., A. Leite-Moreira, and T. Henriques-Coelho, *Cardiovascular effects of the angiotensin type 2 receptor*. Rev Port Cardiol, 2014. **33**(7-8): p. 439-49.
131. Nilius, B. and G. Droogmans, *Ion channels and their functional role in vascular endothelium*. Physiol Rev, 2001. **81**(4): p. 1415-59.
132. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III27-32.
133. Panza, J.A., et al., *Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension*. N Engl J Med, 1990. **323**(1): p. 22-7.
134. Thilo, F., et al., *Increased TRPC3 expression in vascular endothelium of patients with malignant hypertension*. Mod Pathol, 2009. **22**(3): p. 426-30.
135. Wang, R., R. Sauve, and J. de Champlain, *Altered calcium homeostasis in tail artery endothelial cells from spontaneously hypertensive rats*. Am J Hypertens, 1995. **8**(10 Pt 1): p. 1023-30.
136. Verma, S. and T.J. Anderson, *Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist*. Circulation, 2002. **105**(5): p. 546-9.

137. Birch, K.A., et al., *Calcium/calmodulin transduces thrombin-stimulated secretion: studies in intact and minimally permeabilized human umbilical vein endothelial cells*. J Cell Biol, 1992. **118**(6): p. 1501-10.
138. Carter, T.D., et al., *Membrane capacitance changes induced by thrombin and calcium in single endothelial cells cultured from human umbilical vein*. J Physiol, 1998. **513** ( Pt 3): p. 845-55.
139. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Eur Heart J, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.
140. Palmer, R.M., D.S. Ashton, and S. Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. Nature, 1988. **333**(6174): p. 664-6.
141. Ando, J. and K. Yamamoto, *Vascular mechanobiology: endothelial cell responses to fluid shear stress*. Circ J, 2009. **73**(11): p. 1983-92.
142. Lantoiné, F., et al., *Nitric oxide production in human endothelial cells stimulated by histamine requires Ca<sup>2+</sup> influx*. Biochem J, 1998. **330** ( Pt 2): p. 695-9.
143. Schilling, W.P., O.A. Cabello, and L. Rajan, *Depletion of the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive intracellular Ca<sup>2+</sup> store in vascular endothelial cells activates the agonist-sensitive Ca(2+)-influx pathway*. Biochem J, 1992. **284** ( Pt 2): p. 521-30.
144. Bucci, M., et al., *In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation*. Nat Med, 2000. **6**(12): p. 1362-7.
145. Oess, S., et al., *Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases*. Biochem J, 2006. **396**(3): p. 401-9.
146. Feron, O., et al., *The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle*. J Biol Chem, 1998. **273**(6): p. 3125-8.
147. Venema, R.C., et al., *Identification, characterization, and comparison of the calmodulin-binding domains of the endothelial and inducible nitric oxide synthases*. J Biol Chem, 1996. **271**(11): p. 6435-40.
148. Fulton, D., et al., *Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 597-601.
149. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 601-5.

150. Bae, S.W., et al., *Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase A signaling pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **306**(4): p. 981-7.
151. Schneider, J.C., et al., *Involvement of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in endothelial NO production and endothelium-dependent relaxation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(6): p. H2311-9.
152. Cai, H., et al., *Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II/janus kinase 2-dependent pathway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(10): p. 1571-6.
153. Fleming, I., et al., *Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity*. Circ Res, 2001. **88**(11): p. E68-75.
154. Li, H., et al., *Histamine upregulates gene expression of endothelial nitric oxide synthase in human vascular endothelial cells*. Circulation, 2003. **107**(18): p. 2348-54.
155. Garcia-Cardena, G., et al., *Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1*. J Biol Chem, 1996. **271**(44): p. 27237-40.
156. Fleming, I., J. Bauersachs, and R. Busse, *Calcium-dependent and calcium-independent activation of the endothelial NO synthase*. J Vasc Res, 1997. **34**(3): p. 165-74.
157. Ayajiki, K., et al., *Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells*. Circ Res, 1996. **78**(5): p. 750-8.
158. Kuchan, M.J. and J.A. Frangos, *Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells*. Am J Physiol, 1994. **266**(3 Pt 1): p. C628-36.
159. Jin, Z.G., et al., *Flow shear stress stimulates Gab1 tyrosine phosphorylation to mediate protein kinase B and endothelial nitric-oxide synthase activation in endothelial cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(13): p. 12305-9.
160. Bunting, S., S. Moncada, and J.R. Vane, *The prostacyclin--thromboxane A2 balance: pathophysiological and therapeutic implications*. Br Med Bull, 1983. **39**(3): p. 271-6.
161. Thomas, D.W., et al., *Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A2*. J Clin Invest, 1998. **102**(11): p. 1994-2001.

162. Nalefski, E.A., et al., *Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A2, a regulatory Ca(2+)-dependent lipid-binding domain and a Ca(2+)-independent catalytic domain*. J Biol Chem, 1994. **269**(27): p. 18239-49.
163. Flavahan, N.A., *Balancing prostanoid activity in the human vascular system*. Trends Pharmacol Sci, 2007. **28**(3): p. 106-10.
164. Chen, J.K., J. Capdevila, and R.C. Harris, *Cytochrome p450 epoxygenase metabolism of arachidonic acid inhibits apoptosis*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(18): p. 6322-31.
165. Majed, B.H. and R.A. Khalil, *Molecular mechanisms regulating the vascular prostacyclin pathways and their adaptation during pregnancy and in the newborn*. Pharmacol Rev, 2012. **64**(3): p. 540-82.
166. Hirabayashi, T., et al., *Critical duration of intracellular Ca<sup>2+</sup> response required for continuous translocation and activation of cytosolic phospholipase A2*. J Biol Chem, 1999. **274**(8): p. 5163-9.
167. Hirabayashi, T. and T. Shimizu, *Localization and regulation of cytosolic phospholipase A(2)*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1488**(1-2): p. 124-38.
168. Schievella, A.R., et al., *Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 1995. **270**(51): p. 30749-54.
169. Patel, V., et al., *Phosphorylation and activation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinase are required for the P2 purinoceptor stimulation of endothelial prostacyclin production*. Biochem J, 1996. **320** ( Pt 1): p. 221-6.
170. Gijon, M.A. and C.C. Leslie, *Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation*. J Leukoc Biol, 1999. **65**(3): p. 330-6.
171. Kan, H., Y. Ruan, and K.U. Malik, *Signal transduction mechanism(s) involved in prostacyclin production elicited by acetylcholine in coronary endothelial cells of rabbit heart*. J Pharmacol Exp Ther, 1997. **282**(1): p. 113-22.
172. Gosink, E.C. and E.J. Forsberg, *Effects of ATP and bradykinin on endothelial cell Ca<sup>2+</sup> homeostasis and formation of cGMP and prostacyclin*. Am J Physiol, 1993. **265**(6 Pt 1): p. C1620-9.

173. Watanabe, K., G. Lam, and E.A. Jaffe, *The correlation between rises in intracellular calcium and PGI<sub>2</sub> production in cultured vascular endothelial cells*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1992. **46**(3): p. 211-4.
174. Choi, J., L.W. Hammer, and R.L. Hester, *Calcium-dependent synthesis of prostacyclin in ATP-stimulated venous endothelial cells*. Hypertension, 2002. **39**(2 Pt 2): p. 581-5.
175. Whorton, A.R., et al., *The role of calcium in the regulation of prostacyclin synthesis by porcine aortic endothelial cells*. Lipids, 1984. **19**(1): p. 17-24.
176. Brotherton, A.F. and J.C. Hoak, *Role of Ca<sup>2+</sup> and cyclic AMP in the regulation of the production of prostacyclin by the vascular endothelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(2): p. 495-9.
177. Wong, M.S., R.Y. Man, and P.M. Vanhoutte, *Calcium-independent phospholipase A(2) plays a key role in the endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(4): p. H1260-6.
178. Feletou, M. and P.M. Vanhoutte, *Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(6): p. 1215-25.
179. de Wit, C. and T.M. Griffith, *Connexins and gap junctions in the EDHF phenomenon and conducted vasomotor responses*. Pflugers Arch, 2010. **459**(6): p. 897-914.
180. Taylor, M.S., et al., *Altered expression of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure*. Circ Res, 2003. **93**(2): p. 124-31.
181. Grgic, I., et al., *Endothelial Ca<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in normal and impaired EDHF-dilator responses--relevance to cardiovascular pathologies and drug discovery*. Br J Pharmacol, 2009. **157**(4): p. 509-26.
182. Christ, G.J., et al., *Gap junctions in vascular tissues. Evaluating the role of intercellular communication in the modulation of vasomotor tone*. Circ Res, 1996. **79**(4): p. 631-46.
183. Corriu, C., et al., *Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig*. Br J Pharmacol, 1996. **119**(5): p. 959-64.

184. Schilling, W.P., L. Rajan, and E. Strobl-Jager, *Characterization of the bradykinin-stimulated calcium influx pathway of cultured vascular endothelial cells. Saturability, selectivity, and kinetics*. J Biol Chem, 1989. **264**(22): p. 12838-48.
185. Morgan-Boyd, R., et al., *Effects of bradykinin and angiotensin II on intracellular Ca<sup>2+</sup> dynamics in endothelial cells*. Am J Physiol, 1987. **253**(4 Pt 1): p. C588-98.
186. Colden-Stanfield, M., et al., *Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultured bovine aortic endothelial cells*. Circ Res, 1987. **61**(5): p. 632-40.
187. Lambert, T.L., R.S. Kent, and A.R. Whorton, *Bradykinin stimulation of inositol polyphosphate production in porcine aortic endothelial cells*. J Biol Chem, 1986. **261**(32): p. 15288-93.
188. Wesson, D.E. and S.J. Elliott, *The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating enzyme, xanthine oxidase, decreases luminal Ca<sup>2+</sup> content of the IP<sub>3</sub>-sensitive Ca<sup>2+</sup> store in vascular endothelial cells*. Microcirculation, 1995. **2**(2): p. 195-203.
189. Florea, S.M. and L.A. Blatter, *The effect of oxidative stress on Ca<sup>2+</sup> release and capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in vascular endothelial cells*. Cell Calcium, 2008. **43**(4): p. 405-15.
190. Thodeti, C.K., et al., *TRPV4 channels mediate cyclic strain-induced endothelial cell reorientation through integrin-to-integrin signaling*. Circ Res, 2009. **104**(9): p. 1123-30.
191. Yu, R. and P.M. Hinkle, *Rapid turnover of calcium in the endoplasmic reticulum during signaling. Studies with cameleon calcium indicators*. J Biol Chem, 2000. **275**(31): p. 23648-53.
192. Tran, Q.K., K. Ohashi, and H. Watanabe, *Calcium signalling in endothelial cells*. Cardiovasc Res, 2000. **48**(1): p. 13-22.
193. Meldolesi, J. and T. Pozzan, *The endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store: a view from the lumen*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(1): p. 10-4.
194. Taylor, C.W. and S.C. Tovey, *IP(3) receptors: toward understanding their activation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(12): p. a004010.
195. Berridge, M.J., *Inositol trisphosphate and calcium signalling*. Nature, 1993. **361**(6410): p. 315-25.

196. Morris, A.J. and C.C. Malbon, *Physiological regulation of G protein-linked signaling*. *Physiol Rev*, 1999. **79**(4): p. 1373-430.
197. Patel, S., S.K. Joseph, and A.P. Thomas, *Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors*. *Cell Calcium*, 1999. **25**(3): p. 247-64.
198. Boehning, D. and S.K. Joseph, *Direct association of ligand-binding and pore domains in homo- and heterotetrameric inositol 1,4,5-trisphosphate receptors*. *EMBO J*, 2000. **19**(20): p. 5450-9.
199. Mignery, G.A. and T.C. Sudhof, *The ligand binding site and transduction mechanism in the inositol-1,4,5-triphosphate receptor*. *EMBO J*, 1990. **9**(12): p. 3893-8.
200. Marchant, J.S. and C.W. Taylor, *Cooperative activation of IP3 receptors by sequential binding of IP3 and Ca<sup>2+</sup> safeguards against spontaneous activity*. *Curr Biol*, 1997. **7**(7): p. 510-8.
201. Tu, H., Z. Wang, and I. Bezprozvanny, *Modulation of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms by calcium: a role of calcium sensor region*. *Biophys J*, 2005. **88**(2): p. 1056-69.
202. Iwai, M., et al., *Molecular basis of the isoform-specific ligand-binding affinity of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(17): p. 12755-64.
203. Taylor, C.W., A.A. Genazzani, and S.A. Morris, *Expression of inositol trisphosphate receptors*. *Cell Calcium*, 1999. **26**(6): p. 237-51.
204. Foskett, J.K., et al., *Inositol trisphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> release channels*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(2): p. 593-658.
205. Marshall, I.C. and C.W. Taylor, *Biphasic effects of cytosolic Ca<sup>2+</sup> on Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-stimulated Ca<sup>2+</sup> mobilization in hepatocytes*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(18): p. 13214-20.
206. Hamilton, S.L., *Ryanodine receptors*. *Cell Calcium*, 2005. **38**(3-4): p. 253-60.
207. Tu, H., et al., *Functional characterization of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms*. *Biophys J*, 2005. **88**(2): p. 1046-55.
208. Mak, D.O. and J.K. Foskett, *Single-channel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor currents revealed by patch clamp of isolated *Xenopus* oocyte nuclei*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(47): p. 29375-8.

209. Marshall, I.C. and C.W. Taylor, *Two calcium-binding sites mediate the interconversion of liver inositol 1,4,5-trisphosphate receptors between three conformational states*. Biochem J, 1994. **301** ( Pt 2): p. 591-8.
210. Mak, D.O., S. McBride, and J.K. Foskett, *Inositol 1,4,5-trisphosphate [correction of tris-phosphate] activation of inositol trisphosphate [correction of tris-phosphate] receptor Ca<sup>2+</sup> channel by ligand tuning of Ca<sup>2+</sup> inhibition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15821-5.
211. Mak, D.O., S. McBride, and J.K. Foskett, *Regulation by Ca<sup>2+</sup> and inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP3) of single recombinant type 3 InsP3 receptor channels. Ca<sup>2+</sup> activation uniquely distinguishes types 1 and 3 insp3 receptors*. J Gen Physiol, 2001. **117**(5): p. 435-46.
212. Ionescu, L., et al., *Graded recruitment and inactivation of single InsP3 receptor Ca<sup>2+</sup>-release channels: implications for quantal [corrected] Ca<sup>2+</sup> release*. J Physiol, 2006. **573**(Pt 3): p. 645-62.
213. Hirota, J., et al., *Calmodulin inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release through the purified and reconstituted inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type I*. FEBS Lett, 1999. **456**(2): p. 322-6.
214. Missiaen, L., et al., *The bell-shaped Ca<sup>2+</sup> dependence of the inositol 1,4, 5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release is modulated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin*. J Biol Chem, 1999. **274**(20): p. 13748-51.
215. Burdakov, D., O.H. Petersen, and A. Verkhratsky, *Intraluminal calcium as a primary regulator of endoplasmic reticulum function*. Cell Calcium, 2005. **38**(3-4): p. 303-10.
216. Irvine, R.F., *'Quantal' Ca<sup>2+</sup> release and the control of Ca<sup>2+</sup> entry by inositol phosphates--a possible mechanism*. FEBS Lett, 1990. **263**(1): p. 5-9.
217. Ferris, C.D., et al., *Inositol trisphosphate receptor: phosphorylation by protein kinase C and calcium calmodulin-dependent protein kinases in reconstituted lipid vesicles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(6): p. 2232-5.
218. Soulsby, M.D. and R.J. Wojcikiewicz, *The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase at three sites*. Biochem J, 2005. **392**(Pt 3): p. 493-7.



219. Komalavilas, P. and T.M. Lincoln, *Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta*. J Biol Chem, 1996. **271**(36): p. 21933-8.
220. Inoue, R., et al., *Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease*. Circ Res, 2006. **99**(2): p. 119-31.
221. Freichel, M., et al., *Lack of an endothelial store-operated Ca<sup>2+</sup> current impairs agonist-dependent vasorelaxation in TRPV4<sup>-/-</sup> mice*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(2): p. 121-7.
222. Sullivan, M.N. and S. Earley, *TRP channel Ca(2+) sparklets: fundamental signals underlying endothelium-dependent hyperpolarization*. Am J Physiol Cell Physiol, 2013. **305**(10): p. C999-C1008.
223. Hartmannsgruber, V., et al., *Arterial response to shear stress critically depends on endothelial TRPV4 expression*. PLoS One, 2007. **2**(9): p. e827.
224. Mendoza, S.A., et al., *TRPV4-mediated endothelial Ca<sup>2+</sup> influx and vasodilation in response to shear stress*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(2): p. H466-76.
225. Loot, A.E., et al., *Role of cytochrome P450-dependent transient receptor potential V4 activation in flow-induced vasodilatation*. Cardiovasc Res, 2008. **80**(3): p. 445-52.
226. Kochukov, M.Y., et al., *Role of TRPC1 and TRPC3 channels in contraction and relaxation of mouse thoracic aorta*. J Vasc Res, 2013. **50**(1): p. 11-20.
227. Earley, S., A.L. Gonzales, and Z.I. Garcia, *A dietary agonist of transient receptor potential cation channel V3 elicits endothelium-dependent vasodilation*. Mol Pharmacol, 2010. **77**(4): p. 612-20.
228. Sonkusare, S.K., et al., *AKAP150-dependent cooperative TRPV4 channel gating is central to endothelium-dependent vasodilation and is disrupted in hypertension*. Sci Signal, 2014. **7**(333): p. ra66.
229. Huang, Y., et al., *A single EF-hand isolated from STIM1 forms dimer in the absence and presence of Ca<sup>2+</sup>*. FEBS J, 2009. **276**(19): p. 5589-97.
230. Penna, A., et al., *The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers*. Nature, 2008. **456**(7218): p. 116-20.
231. Hewavitharana, T., et al., *Role of STIM and Orai proteins in the store-operated calcium signaling pathway*. Cell Calcium, 2007. **42**(2): p. 173-82.

232. Bolotina, V.M., Orai, *STIM1 and iPLA2beta: a view from a different perspective*. J Physiol, 2008. **586**(13): p. 3035-42.
233. Li, L., et al., *Agonist-stimulated calcium entry in primary cultures of human cerebral microvascular endothelial cells*. Microvasc Res, 1999. **57**(3): p. 211-26.
234. Tran, Q.K. and H. Watanabe, *Calcium signalling in the endothelium*. Handb Exp Pharmacol, 2006(176 Pt 1): p. 145-87.
235. Zhang, D.X. and D.D. Gutterman, *Transient receptor potential channel activation and endothelium-dependent dilation in the systemic circulation*. J Cardiovasc Pharmacol, 2011. **57**(2): p. 133-9.
236. Hadri, L., et al., *SERCA2a gene transfer enhances eNOS expression and activity in endothelial cells*. Mol Ther, 2010. **18**(7): p. 1284-92.
237. Van Baelen, K., et al., *The Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> pumps in the Golgi apparatus*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1742**(1-3): p. 103-12.
238. Periasamy, M. and A. Kalyanasundaram, *SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease*. Muscle Nerve, 2007. **35**(4): p. 430-42.
239. Simmerman, H.K. and L.R. Jones, *Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function*. Physiol Rev, 1998. **78**(4): p. 921-47.
240. DeSantiago, J., L.S. Maier, and D.M. Bers, *Phospholamban is required for CaMKII-dependent recovery of Ca transients and SR Ca reuptake during acidosis in cardiac myocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **36**(1): p. 67-74.
241. Sutliff, R.L., et al., *Phospholamban is present in endothelial cells and modulates endothelium-dependent relaxation. Evidence from phospholamban gene-ablated mice*. Circ Res, 1999. **84**(3): p. 360-4.
242. Liu, L.H., et al., *Defective endothelium-dependent relaxation of vascular smooth muscle and endothelial cell Ca<sup>2+</sup> signaling in mice lacking sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoform 3*. J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30538-45.
243. Giacomello, M., et al., *Plasma membrane calcium ATPases and related disorders*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(3): p. 753-62.
244. Lopreiato, R., M. Giacomello, and E. Carafoli, *The plasma membrane calcium pump: new ways to look at an old enzyme*. J Biol Chem, 2014. **289**(15): p. 10261-8.

245. Brini, M., et al., *The plasma membrane calcium pump in health and disease*. FEBS J, 2013. **280**(21): p. 5385-97.
246. Holton, M., et al., *Endothelial nitric oxide synthase activity is inhibited by the plasma membrane calcium ATPase in human endothelial cells*. Cardiovasc Res, 2010. **87**(3): p. 440-8.
247. Szewczyk, M.M., et al., *Ca<sup>2+</sup>-pumps and Na<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-exchangers in coronary artery endothelium versus smooth muscle*. J Cell Mol Med, 2007. **11**(1): p. 129-38.
248. Pande, J., et al., *Aortic smooth muscle and endothelial plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump isoforms are inhibited differently by the extracellular inhibitor caloxin 1b1*. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. **290**(5): p. C1341-9.
249. Brini, M. and E. Carafoli, *The plasma membrane Ca(2)+ ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(2).
250. Griff, E.R., N.K. Kleene, and S.J. Kleene, *A selective PMCA inhibitor does not prolong the electroolfactogram in mouse*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37148.
251. Carafoli, E., *The plasma membrane calcium pump in the hearing process: physiology and pathology*. Sci China Life Sci, 2011. **54**(8): p. 686-90.
252. Philipson, K.D. and D.A. Nicoll, *Sodium-calcium exchange: a molecular perspective*. Annu Rev Physiol, 2000. **62**: p. 111-33.
253. Quednau, B.D., D.A. Nicoll, and K.D. Philipson, *The sodium/calcium exchanger family-SLC8*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 543-8.
254. Teubl, M., et al., *Na(+)/Ca(2+) exchange facilitates Ca(2+)-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 1999. **274**(41): p. 29529-35.
255. Bernardi, P., *Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition*. Physiol Rev, 1999. **79**(4): p. 1127-55.
256. Davis, K.A., et al., *Functional linkage of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-exchanger to sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump in coronary artery: comparison of smooth muscle and endothelial cells*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(8B): p. 1775-83.
257. Wang, J., et al., *Cytoplasmic tail of phospholemman interacts with the intracellular loop of the cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger*. J Biol Chem, 2006. **281**(42): p. 32004-14.

258. Zhang, X.Q., et al., *Phospholemman inhibition of the cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. Role of phosphorylation*. J Biol Chem, 2006. **281**(12): p. 7784-92.
259. Zhang, X.Q., et al., *Phospholemman modulates Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in adult rat cardiac myocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(1): p. H225-33.
260. Blaustein, M.P. and W.J. Lederer, *Sodium/calcium exchange: its physiological implications*. Physiol Rev, 1999. **79**(3): p. 763-854.
261. Cannell, M.B. and S.O. Sage, *Bradykinin-evoked changes in cytosolic calcium and membrane currents in cultured bovine pulmonary artery endothelial cells*. J Physiol, 1989. **419**: p. 555-68.
262. Sedova, M. and L.A. Blatter, *Dynamic regulation of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> by plasma membrane Ca(2<sup>+</sup>)-ATPase and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange during capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in bovine vascular endothelial cells*. Cell Calcium, 1999. **25**(5): p. 333-43.
263. Iwamoto, T. and S. Kita, *Topics on the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger: role of vascular NCX1 in salt-dependent hypertension*. J Pharmacol Sci, 2006. **102**(1): p. 32-6.
264. Zhang, S., et al., *Upregulation of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger contributes to the enhanced Ca<sup>2+</sup> entry in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(6): p. C2297-305.
265. Munch, G., et al., *Functional alterations after cardiac sodium-calcium exchanger overexpression in heart failure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(2): p. H488-95.
266. Jouaville, L.S., et al., *Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24): p. 13807-12.
267. Denton, R.M., J.G. McCormack, and N.J. Edgell, *Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. Effects of Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> and ruthenium red on the Ca<sup>2+</sup>-stimulated oxidation of oxoglutarate and on pyruvate dehydrogenase activity in intact rat heart mitochondria*. Biochem J, 1980. **190**(1): p. 107-17.
268. Gunter, T.E. and D.R. Pfeiffer, *Mechanisms by which mitochondria transport calcium*. Am J Physiol, 1990. **258**(5 Pt 1): p. C755-86.

269. Carafoli, E., *The fateful encounter of mitochondria with calcium: how did it happen?* Biochim Biophys Acta, 2010. **1797**(6-7): p. 595-606.
270. Hoppe, U.C., *Mitochondrial calcium channels.* FEBS Lett, 2010. **584**(10): p. 1975-81.
271. Gincel, D., H. Zaid, and V. Shoshan-Barmatz, *Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function.* Biochem J, 2001. **358**(Pt 1): p. 147-55.
272. Patergnani, S., et al., *Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs).* Cell Commun Signal, 2011. **9**: p. 19.
273. Arnaudeau, S., et al., *Mitochondria recycle  $\text{Ca}(2+)$  to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions.* J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 29430-9.
274. Rizzuto, R., et al., *Microdomains with high  $\text{Ca}^{2+}$  close to  $\text{IP}_3$ -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria.* Science, 1993. **262**(5134): p. 744-7.
275. Rizzuto, R., et al., *Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  responses.* Science, 1998. **280**(5370): p. 1763-6.
276. Saris, N.E. and E. Carafoli, *A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria.* Biochemistry (Mosc), 2005. **70**(2): p. 187-94.
277. Bernardi, P. and M. Forte, *The mitochondrial permeability transition pore.* Novartis Found Symp, 2007. **287**: p. 157-64; discussion 164-9.
278. Vandecasteele, G., G. Szabadkai, and R. Rizzuto, *Mitochondrial calcium homeostasis: mechanisms and molecules.* IUBMB Life, 2001. **52**(3-5): p. 213-9.
279. Boitier, E., R. Rea, and M.R. Duchen, *Mitochondria exert a negative feedback on the propagation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  waves in rat cortical astrocytes.* J Cell Biol, 1999. **145**(4): p. 795-808.
280. Wood, P.G. and J.I. Gillespie, *Evidence for mitochondrial  $\text{Ca}(2+)$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in permeabilised endothelial cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. **246**(2): p. 543-8.
281. Park, M.K., et al., *Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport.* EMBO J, 2001. **20**(8): p. 1863-74.

282. Rizzuto, R., M.R. Duchen, and T. Pozzan, *Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca<sup>2+</sup> liaison*. Sci STKE, 2004. **2004**(215): p. re1.
283. Malli, R., et al., *Mitochondria efficiently buffer subplasmalemmal Ca<sup>2+</sup> elevation during agonist stimulation*. J Biol Chem, 2003. **278**(12): p. 10807-15.
284. Malli, R., et al., *Sustained Ca<sup>2+</sup> transfer across mitochondria is Essential for mitochondrial Ca<sup>2+</sup> buffering, store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, and Ca<sup>2+</sup> store refilling*. J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 44769-79.
285. Davidson, S.M. and M.R. Duchen, *Endothelial mitochondria: contributing to vascular function and disease*. Circ Res, 2007. **100**(8): p. 1128-41.
286. Dedkova, E.N. and L.A. Blatter, *Modulation of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> by nitric oxide in cultured bovine vascular endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(4): p. C836-45.
287. Dedkova, E.N., et al., *Mitochondrial calcium uptake stimulates nitric oxide production in mitochondria of bovine vascular endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **286**(2): p. C406-15.
288. Giorgi, C., et al., *Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine*. Mitochondrion, 2012. **12**(1): p. 77-85.
289. Giorgi, C., et al., *Ca<sup>2+</sup> signaling, mitochondria and cell death*. Curr Mol Med, 2008. **8**(2): p. 119-30.
290. Chen, H.I., et al., *Endothelial calcium signaling in rabbit arteries and its local alterations in early-stage atherosclerosis*. J Biomed Sci, 2007. **14**(1): p. 145-53.
291. Jen, C.J., H.P. Chan, and H.I. Chen, *Chronic exercise improves endothelial calcium signaling and vasodilatation in hypercholesterolemic rabbit femoral artery*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(7): p. 1219-24.
292. Wang, R., R. Sauve, and J. de Champlain, *Abnormal regulation of cytosolic free calcium in vascular endothelial cells from spontaneously hypertensive rats*. J Hypertens, 1995. **13**(9): p. 993-1001.
293. Feletou, M., R. Kohler, and P.M. Vanhoutte, *Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets*. Curr Hypertens Rep, 2010. **12**(4): p. 267-75.

294. Munaron, L. and A. Fiorio Pla, *Endothelial calcium machinery and angiogenesis: understanding physiology to interfere with pathology*. Curr Med Chem, 2009. **16**(35): p. 4691-703.
295. Busse, R., et al., *Hyperpolarization and increased free calcium in acetylcholine-stimulated endothelial cells*. Am J Physiol, 1988. **255**(4 Pt 2): p. H965-9.
296. Geiger, R.V., et al., *Flow-induced calcium transients in single endothelial cells: spatial and temporal analysis*. Am J Physiol, 1992. **262**(6 Pt 1): p. C1411-7.
297. Ishida, T., et al., *Fluid shear stress-mediated signal transduction: how do endothelial cells transduce mechanical force into biological responses?* Ann N Y Acad Sci, 1997. **811**: p. 12-23; discussion 23-4.
298. Charbel, C., F. Toussaint, and J. Ledoux, *Les dynamiques calciques : Côté Lumineux de la signalisation endothéliale*. Médecine Sciences Amérique, 2013. **Vol. 2**(CRCQ-2012).
299. Otun, H., et al., *Interactions between inositol trisphosphate and Ca<sup>2+</sup> dependent Ca<sup>2+</sup> release mechanisms on the endoplasmic reticulum of permeabilised bovine aortic endothelial cells*. Cell Calcium, 1996. **19**(4): p. 315-25.
300. Beliveau, E., F. Lapointe, and G. Guillemette, *The activation state of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates the velocity of intracellular Ca<sup>2+</sup> waves in bovine aortic endothelial cells*. J Cell Biochem, 2011. **112**(12): p. 3722-31.
301. Beech, D.J., *Harmony and discord in endothelial calcium entry*. Circ Res, 2009. **104**(2): p. e22-3.
302. Busse, R. and A. Mulsch, *Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin*. FEBS Lett, 1990. **265**(1-2): p. 133-6.
303. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9265-9.
304. Xia, X.M., et al., *Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels*. Nature, 1998. **395**(6701): p. 503-7.
305. Crane, G.J., et al., *Small- and intermediate-conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channels provide different facets of endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery*. J Physiol, 2003. **553**(Pt 1): p. 183-9.

306. Hoebel, B.G., G.M. Kostner, and W.F. Graier, *Activation of microsomal cytochrome P450 mono-oxygenase by Ca<sup>2+</sup> store depletion and its contribution to Ca<sup>2+</sup> entry in porcine aortic endothelial cells*. Br J Pharmacol, 1997. **121**(8): p. 1579-88.
307. Berridge, M.J., *Elementary and global aspects of calcium signalling*. J Physiol, 1997. **499 ( Pt 2)**: p. 291-306.
308. Bootman, M.D., P. Lipp, and M.J. Berridge, *The organisation and functions of local Ca(2+) signals*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 12): p. 2213-22.
309. Huser, J. and L.A. Blatter, *Elementary events of agonist-induced Ca<sup>2+</sup> release in vascular endothelial cells*. Am J Physiol, 1997. **273**(5 Pt 1): p. C1775-82.
310. Parker, I., J. Choi, and Y. Yao, *Elementary events of InsP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> liberation in Xenopus oocytes: hot spots, puffs and blips*. Cell Calcium, 1996. **20**(2): p. 105-21.
311. Parker, I. and Y. Yao, *Regenerative release of calcium from functionally discrete subcellular stores by inositol trisphosphate*. Proc Biol Sci, 1991. **246**(1317): p. 269-74.
312. Parker, I. and Y. Yao, *Ca<sup>2+</sup> transients associated with openings of inositol trisphosphate-gated channels in Xenopus oocytes*. J Physiol, 1996. **491 ( Pt 3)**: p. 663-8.
313. Bootman, M.D., M.J. Berridge, and P. Lipp, *Cooking with calcium: the recipes for composing global signals from elementary events*. Cell, 1997. **91**(3): p. 367-73.
314. Ying, X., et al., *Ca<sup>2+</sup> waves in lung capillary endothelium*. Circ Res, 1996. **79**(4): p. 898-908.
315. Burdyga, T., et al., *A new technique for simultaneous and in situ measurements of Ca<sup>2+</sup> signals in arteriolar smooth muscle and endothelial cells*. Cell Calcium, 2003. **34**(1): p. 27-33.
316. Bootman, M., et al., *Imaging the hierarchical Ca<sup>2+</sup> signalling system in HeLa cells*. J Physiol, 1997. **499 ( Pt 2)**: p. 307-14.
317. Cheng, H. and W.J. Lederer, *Calcium sparks*. Physiol Rev, 2008. **88**(4): p. 1491-545.
318. De Koninck, P. and H. Schulman, *Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations*. Science, 1998. **279**(5348): p. 227-30.
319. Santana, L.F. and M.F. Navedo, *Molecular and biophysical mechanisms of Ca<sup>2+</sup> sparklets in smooth muscle*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **47**(4): p. 436-44.



320. Sullivan, M.N., et al., *Optical recording reveals novel properties of GSK1016790A-induced vanilloid transient receptor potential channel TRPV4 activity in primary human endothelial cells*. Mol Pharmacol, 2012. **82**(3): p. 464-72.
321. Sullivan, M.N., et al., *Localized TRPA1 channel Ca<sup>2+</sup> signals stimulated by reactive oxygen species promote cerebral artery dilation*. Sci Signal, 2015. **8**(358): p. ra2.
322. Willette, R.N., et al., *Systemic activation of the transient receptor potential vanilloid subtype 4 channel causes endothelial failure and circulatory collapse: Part 2*. J Pharmacol Exp Ther, 2008. **326**(2): p. 443-52.
323. Erondy, N.E. and M.B. Kennedy, *Regional distribution of type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in rat brain*. J Neurosci, 1985. **5**(12): p. 3270-7.
324. O'Leary, H., E. Lasda, and K.U. Bayer, *CaMKII $\beta$  association with the actin cytoskeleton is regulated by alternative splicing*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(11): p. 4656-65.
325. Wayman, G.A., et al., *Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity*. Neuron, 2008. **59**(6): p. 914-31.
326. Lin, Y.C. and L. Redmond, *Neuronal CaMKII acts as a structural kinase*. Commun Integr Biol, 2009. **2**(1): p. 40-1.
327. Okamoto, K., M. Bosch, and Y. Hayashi, *The roles of CaMKII and F-actin in the structural plasticity of dendritic spines: a potential molecular identity of a synaptic tag?* Physiology (Bethesda), 2009. **24**: p. 357-66.
328. Lisman, J., R. Yasuda, and S. Raghavachari, *Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation*. Nat Rev Neurosci, 2012. **13**(3): p. 169-82.
329. Couchonnal, L.F. and M.E. Anderson, *The role of calmodulin kinase II in myocardial physiology and disease*. Physiology (Bethesda), 2008. **23**: p. 151-9.
330. Mishra, S., et al., *Cardiac hypertrophy and heart failure development through Gq and CaM kinase II signaling*. J Cardiovasc Pharmacol, 2010. **56**(6): p. 598-603.
331. Singh, M.V. and M.E. Anderson, *Is CaMKII a link between inflammation and hypertrophy in heart?* J Mol Med (Berl), 2011. **89**(6): p. 537-43.
332. Swaminathan, P.D., et al., *Calmodulin-dependent protein kinase II: linking heart failure and arrhythmias*. Circ Res, 2012. **110**(12): p. 1661-77.

333. Li, W., et al., *The multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II delta (CaMKIIdelta) controls neointima formation after carotid ligation and vascular smooth muscle cell proliferation through cell cycle regulation by p21*. J Biol Chem, 2011. **286**(10): p. 7990-9.
334. Scott, J.A., et al., *The multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II regulates vascular smooth muscle migration through matrix metalloproteinase 9*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(10): p. H1953-64.
335. Mercure, M.Z., R. Ginnan, and H.A. Singer, *CaM kinase II delta2-dependent regulation of vascular smooth muscle cell polarization and migration*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **294**(6): p. C1465-75.
336. Li, H., et al., *Calmodulin kinase II is required for angiotensin II-mediated vascular smooth muscle hypertrophy*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(2): p. H688-98.
337. Cipolletta, E., et al., *Calmodulin-dependent kinase II mediates vascular smooth muscle cell proliferation and is potentiated by extracellular signal regulated kinase*. Endocrinology, 2010. **151**(6): p. 2747-59.
338. Kim, I., et al., *Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase II-dependent activation of contractility in ferret aorta*. J Physiol, 2000. **526 Pt 2**: p. 367-74.
339. Rokolya, A. and H.A. Singer, *Inhibition of CaM kinase II activation and force maintenance by KN-93 in arterial smooth muscle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2000. **278**(3): p. C537-45.
340. Muthalif, M.M., et al., *Functional significance of activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in angiotensin II--induced vascular hyperplasia and hypertension*. Hypertension, 2002. **39**(2 Pt 2): p. 704-9.
341. House, S.J. and H.A. Singer, *CaMKII-delta isoform regulation of neointima formation after vascular injury*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. 441-7.
342. Bayer, K.U., P. De Koninck, and H. Schulman, *Alternative splicing modulates the frequency-dependent response of CaMKII to Ca(2+) oscillations*. EMBO J, 2002. **21**(14): p. 3590-7.

343. Tobimatsu, T. and H. Fujisawa, *Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs*. J Biol Chem, 1989. **264**(30): p. 17907-12.
344. Kanaseki, T., et al., *Structural features of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II revealed by electron microscopy*. J Cell Biol, 1991. **115**(4): p. 1049-60.
345. Kolodziej, S.J., et al., *Three-dimensional reconstructions of calcium/calmodulin-dependent (CaM) kinase IIalpha and truncated CaM kinase IIalpha reveal a unique organization for its structural core and functional domains*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14354-9.
346. Morris, E.P. and K. Torok, *Oligomeric structure of alpha-calmodulin-dependent protein kinase II*. J Mol Biol, 2001. **308**(1): p. 1-8.
347. Hoelz, A., A.C. Nairn, and J. Kuriyan, *Crystal structure of a tetradecameric assembly of the association domain of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II*. Mol Cell, 2003. **11**(5): p. 1241-51.
348. Brocke, L., et al., *Functional implications of the subunit composition of neuronal CaM kinase II*. J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22713-22.
349. Bayer, K.U. and H. Schulman, *Regulation of signal transduction by protein targeting: the case for CaMKII*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(5): p. 917-23.
350. Soderling, T.R., B. Chang, and D. Brickey, *Cellular signaling through multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II*. J Biol Chem, 2001. **276**(6): p. 3719-22.
351. Schulman, H., *Activity-dependent regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II localization*. J Neurosci, 2004. **24**(39): p. 8399-403.
352. Ohta, Y., E. Nishida, and H. Sakai, *Type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase binds to actin filaments in a calmodulin-sensitive manner*. FEBS Lett, 1986. **208**(2): p. 423-6.
353. Shen, K., et al., *CaMKIIbeta functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKIIalpha/beta heterooligomers to dendritic spines*. Neuron, 1998. **21**(3): p. 593-606.
354. Shen, K. and T. Meyer, *Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation*. Science, 1999. **284**(5411): p. 162-6.

355. Elgersma, Y., et al., *Inhibitory autophosphorylation of CaMKII controls PSD association, plasticity, and learning*. Neuron, 2002. **36**(3): p. 493-505.
356. Fink, C.C., et al., *Selective regulation of neurite extension and synapse formation by the beta but not the alpha isoform of CaMKII*. Neuron, 2003. **39**(2): p. 283-97.
357. Brocke, L., M. Srinivasan, and H. Schulman, *Developmental and regional expression of multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase isoforms in rat brain*. J Neurosci, 1995. **15**(10): p. 6797-808.
358. Srinivasan, M., C.F. Edman, and H. Schulman, *Alternative splicing introduces a nuclear localization signal that targets multifunctional CaM kinase to the nucleus*. J Cell Biol, 1994. **126**(4): p. 839-52.
359. Ramirez, M.T., et al., *The nuclear deltaB isoform of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II regulates atrial natriuretic factor gene expression in ventricular myocytes*. J Biol Chem, 1997. **272**(49): p. 31203-8.
360. Gaudilliere, B., et al., *A CaMKII-NeuroD signaling pathway specifies dendritic morphogenesis*. Neuron, 2004. **41**(2): p. 229-41.
361. Mishra, S., et al., *Location matters: clarifying the concept of nuclear and cytosolic CaMKII subtypes*. Circ Res, 2011. **109**(12): p. 1354-62.
362. Hain, J., et al., *Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle*. J Biol Chem, 1995. **270**(5): p. 2074-81.
363. Hanson, P.I., et al., *Dual role of calmodulin in autophosphorylation of multifunctional CaM kinase may underlie decoding of calcium signals*. Neuron, 1994. **12**(5): p. 943-56.
364. Meyer, T., et al., *Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase*. Science, 1992. **256**(5060): p. 1199-202.
365. He, B.J., et al., *Oxidation of CaMKII determines the cardiotoxic effects of aldosterone*. Nat Med, 2011. **17**(12): p. 1610-8.
366. Howe, C.J., et al., *Redox regulation of the calcium/calmodulin-dependent protein kinases*. J Biol Chem, 2004. **279**(43): p. 44573-81.
367. Erickson, J.R., et al., *A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation*. Cell, 2008. **133**(3): p. 462-74.

368. Patton, B.L., S.G. Miller, and M.B. Kennedy, *Activation of type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase by  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin is inhibited by autophosphorylation of threonine within the calmodulin-binding domain*. J Biol Chem, 1990. **265**(19): p. 11204-12.
369. Colbran, R.J., *Inactivation of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II by basal autophosphorylation*. J Biol Chem, 1993. **268**(10): p. 7163-70.
370. Hanson, P.I. and H. Schulman, *Inhibitory autophosphorylation of multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase analyzed by site-directed mutagenesis*. J Biol Chem, 1992. **267**(24): p. 17216-24.
371. Hanson, P.I., et al., *Expression of a multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase and mutational analysis of its autoregulation*. Neuron, 1989. **3**(1): p. 59-70.
372. Dosemeci, A., N. Gollop, and H. Jaffe, *Identification of a major autophosphorylation site on postsynaptic density-associated  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 1994. **269**(50): p. 31330-3.
373. Miguez, P.V., et al., *Phosphorylation of CaMKII at Thr253 occurs in vivo and enhances binding to isolated postsynaptic densities*. J Neurochem, 2006. **98**(1): p. 289-99.
374. Gurd, J.W., et al., *Ischemia and status epilepticus result in enhanced phosphorylation of calcium and calmodulin-stimulated protein kinase II on threonine 253*. Brain Res, 2008. **1218**: p. 158-65.
375. Cai, H., D. Liu, and J.G. Garcia, *CaM Kinase II-dependent pathophysiological signalling in endothelial cells*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(1): p. 30-4.
376. Griffith, L.C., *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: an unforgettable kinase*. J Neurosci, 2004. **24**(39): p. 8391-3.
377. Hanson, P.I. and H. Schulman, *Neuronal  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinases*. Annu Rev Biochem, 1992. **61**: p. 559-601.
378. Czernik, A.J., D.T. Pang, and P. Greengard, *Amino acid sequences surrounding the cAMP-dependent and calcium/calmodulin-dependent phosphorylation sites in rat and bovine synapsin I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7518-22.

379. Soderling, T.R., *Calcium-dependent protein kinases in learning and memory*. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res, 1995. **30**: p. 175-89.
380. Erickson, J.R., et al., *CaMKII in the cardiovascular system: sensing redox states*. Physiol Rev, 2011. **91**(3): p. 889-915.
381. Currie, S., et al., *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II $\delta$  associates with the ryanodine receptor complex and regulates channel function in rabbit heart*. Biochem J, 2004. **377**(Pt 2): p. 357-66.
382. Wehrens, X.H., et al., *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor*. Circ Res, 2004. **94**(6): p. e61-70.
383. Yang, D., et al., *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II-dependent phosphorylation of ryanodine receptors suppresses Ca<sup>2+</sup> sparks and Ca<sup>2+</sup> waves in cardiac myocytes*. Circ Res, 2007. **100**(3): p. 399-407.
384. Xu, A., C. Hawkins, and N. Narayanan, *Phosphorylation and activation of the Ca(2+)-pumping ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 1993. **268**(12): p. 8394-7.
385. Xu, A. and N. Narayanan, *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent phosphorylation of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase, uncoupled from phospholamban, stimulates Ca<sup>2+</sup>-pumping in native cardiac sarcoplasmic reticulum*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **258**(1): p. 66-72.
386. Wegener, A.D., et al., *Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation*. J Biol Chem, 1989. **264**(19): p. 11468-74.
387. Simmerman, H.K., et al., *Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains*. J Biol Chem, 1986. **261**(28): p. 13333-41.
388. Bayer, K.U., K. Harbers, and H. Schulman, *alphaKAP is an anchoring protein for a novel CaM kinase II isoform in skeletal muscle*. EMBO J, 1998. **17**(19): p. 5598-605.
389. Maxwell, J.T., S. Natesan, and G.A. Mignery, *Modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2 channel activity by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)-mediated phosphorylation*. J Biol Chem, 2012. **287**(47): p. 39419-28.

390. Bare, D.J., et al., *Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: interaction and modulation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*. J Biol Chem, 2005. **280**(16): p. 15912-20.
391. McCarron, J.G., et al., *Calcium-dependent enhancement of calcium current in smooth muscle by calmodulin-dependent protein kinase II*. Nature, 1992. **357**(6373): p. 74-7.
392. Braun, A.P. and H. Schulman, *The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function*. Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 417-45.
393. Varga, A.W., et al., *Calcium-calmodulin-dependent kinase II modulates Kv4.2 channel expression and upregulates neuronal A-type potassium currents*. J Neurosci, 2004. **24**(14): p. 3643-54.
394. van Welie, I. and S. du Lac, *Bidirectional control of BK channel open probability by CAMKII and PKC in medial vestibular nucleus neurons*. J Neurophysiol, 2011. **105**(4): p. 1651-9.
395. Yoon, J.Y., et al., *Constitutive CaMKII activity regulates Na<sup>+</sup> channel in rat ventricular myocytes*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **47**(4): p. 475-84.
396. Vinogradova, T.M., et al., *Sinoatrial node pacemaker activity requires Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II activation*. Circ Res, 2000. **87**(9): p. 760-7.
397. ER, O.B., et al., *Pathogenesis of neointima formation following vascular injury*. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2011. **11**(1): p. 30-9.
398. Backs, J., et al., *CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1853-64.
399. Prasad, A.M., et al., *Differential control of calcium homeostasis and vascular reactivity by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II*. Hypertension, 2013. **62**(2): p. 434-41.
400. Grueter, C.E., et al., *L-type Ca<sup>2+</sup> channel facilitation mediated by phosphorylation of the beta subunit by CaMKII*. Mol Cell, 2006. **23**(5): p. 641-50.
401. Zhang, R., et al., *A dynamic alpha-beta inter-subunit agonist signaling complex is a novel feedback mechanism for regulating L-type Ca<sup>2+</sup> channel opening*. FASEB J, 2005. **19**(11): p. 1573-5.

402. Grueter, C.E., et al., *Differential regulated interactions of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II with isoforms of voltage-gated calcium channel beta subunits*. Biochemistry, 2008. **47**(6): p. 1760-7.
403. Deli, M.A., et al., *Calcium/calmodulin-stimulated protein kinase II is present in primary cultures of cerebral endothelial cells*. J Neurochem, 1993. **60**(5): p. 1960-3.
404. Wang, Z., et al., *Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II delta 6 (CaMKIIdelta6) and RhoA involvement in thrombin-induced endothelial barrier dysfunction*. J Biol Chem, 2010. **285**(28): p. 21303-12.
405. Balla, Z., et al., *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIdelta 2 and gamma isoforms regulate potassium currents of rat brain capillary endothelial cells under hypoxic conditions*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21306-14.
406. Wang, Q., et al., *A novel anti-inflammatory peptide inhibits endothelial cell cytoskeletal rearrangement, nitric oxide synthase translocation, and paracellular permeability increases*. J Cell Physiol, 1997. **172**(2): p. 171-82.
407. Wang, Q., et al., *Filamin translocation is an early endothelial cell inflammatory response to bradykinin: regulation by calcium, protein kinases, and protein phosphatases*. J Cell Biochem, 1996. **62**(3): p. 383-96.
408. Borbiev, T., et al., *Regulation of endothelial cell barrier function by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **280**(5): p. L983-90.
409. Ohta, Y. and J.H. Hartwig, *Actin filament cross-linking by chicken gizzard filamin is regulated by phosphorylation in vitro*. Biochemistry, 1995. **34**(20): p. 6745-54.
410. Huang, C.C. and K.S. Hsu, *Activation of NMDA receptors reduces metabotropic glutamate receptor-induced long-term depression in the nucleus accumbens via a CaMKII-dependent mechanism*. Neuropharmacology, 2012. **63**(8): p. 1298-307.
411. Borbiev, T., et al., *Role of CaM kinase II and ERK activation in thrombin-induced endothelial cell barrier dysfunction*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **285**(1): p. L43-54.
412. Meoli, D.F. and R.J. White, *Thrombin induces fibronectin-specific migration of pulmonary microvascular endothelial cells: requirement of calcium/calmodulin-*



- dependent protein kinase II*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009. **297**(4): p. L706-14.
413. Banumathi, E., et al., *VEGF-induced retinal angiogenic signaling is critically dependent on Ca(2)(+) signaling by Ca(2)(+)/calmodulin-dependent protein kinase II*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(6): p. 3103-11.
  414. Li, J., et al., *Calcium entry mediates hyperglycemia-induced apoptosis through Ca(2+)/calmodulin-dependent kinase II in retinal capillary endothelial cells*. Mol Vis, 2012. **18**: p. 2371-9.
  415. Zhu, D.M., et al., *Reversible phosphorylation as a controlling factor for sustaining calcium oscillations in HeLa cells: Involvement of calmodulin-dependent kinase II and a calyculin A-inhibitable phosphatase*. Biochemistry, 1996. **35**(22): p. 7214-23.
  416. Aromolaran, A.A. and L.A. Blatter, *Modulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> release and capacitative Ca<sup>2+</sup> entry by CaMKII inhibitors in bovine vascular endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(6): p. C1426-36.
  417. Aromolaran, A.S., A.V. Zima, and L.A. Blatter, *Role of glycolytically generated ATP for CaMKII-mediated regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in bovine vascular endothelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**(1): p. C106-18.
  418. Nakane, M., et al., *Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **180**(3): p. 1396-402.
  419. Hayashi, Y., et al., *Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases*. J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20597-602.
  420. Komeima, K., et al., *Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIalpha through Ser847 phosphorylation in NG108-15 neuronal cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(36): p. 28139-43.
  421. Kobayashi, T., et al., *Involvement of CaM kinase II in the impairment of endothelial function and eNOS activity in aortas of Type 2 diabetic rats*. Clin Sci (Lond), 2012. **123**(6): p. 375-86.
  422. Drummond, G.R., et al., *Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide*. Circ Res, 2000. **86**(3): p. 347-54.

423. Cai, H., et al., *Oscillatory shear stress upregulation of endothelial nitric oxide synthase requires intracellular hydrogen peroxide and CaMKII*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(1): p. 121-5.
424. Zhang, T. and J.H. Brown, *Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure*. Cardiovasc Res, 2004. **63**(3): p. 476-86.
425. Yousif, M.H., *Signal transduction through Ras-GTPase and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to development of diabetes-induced renal vascular dysfunction*. Cell Biochem Funct, 2006. **24**(4): p. 299-305.
426. Yousif, M.H., et al., *Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in development of vascular dysfunction in diabetic rats with hypertension*. Cell Biochem Funct, 2008. **26**(2): p. 256-63.
427. Yousif, M.H., I.F. Benter, and S. Akhtar, *Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II normalizes diabetes-induced abnormal vascular reactivity in the rat perfused mesenteric vascular bed*. Auton Autacoid Pharmacol, 2003. **23**(1): p. 27-33.
428. Makino, A., K. Ohuchi, and K. Kamata, *Mechanisms underlying the attenuation of endothelium-dependent vasodilatation in the mesenteric arterial bed of the streptozotocin-induced diabetic rat*. Br J Pharmacol, 2000. **130**(3): p. 549-56.
429. Bhardwaj, S.K. and G. Kaur, *Effect of diabetes on calcium/calmodulin dependent protein kinase-II from rat brain*. Neurochem Int, 1999. **35**(4): p. 329-35.
430. Vanhoutte, P.M., *Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture*. Hypertension, 1989. **13**(6 Pt 2): p. 658-67.
431. Cardillo, C., et al., *Selective defect in nitric oxide synthesis may explain the impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension*. Circulation, 1998. **97**(9): p. 851-6.
432. Cardillo, C. and J.A. Panza, *Impaired endothelial regulation of vascular tone in patients with systemic arterial hypertension*. Vasc Med, 1998. **3**(2): p. 138-44.
433. Todoki, K., et al., *Oxygen free radical-mediated selective endothelial dysfunction in isolated coronary artery*. Am J Physiol, 1992. **262**(3 Pt 2): p. H806-12.
434. Sies, H., *Oxidative stress: from basic research to clinical application*. Am J Med, 1991. **91**(3C): p. 31S-38S.

435. Touyz, R.M., F. Tabet, and E.L. Schiffrin, *Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2003. **30**(11): p. 860-6.
436. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. Circ Res, 2000. **87**(10): p. 840-4.
437. Virdis, A., et al., *Role of NAD(P)H oxidase on vascular alterations in angiotensin II-infused mice*. J Hypertens, 2004. **22**(3): p. 535-42.
438. Laursen, J.B., et al., *Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension*. Circulation, 1997. **95**(3): p. 588-93.
439. Rajagopalan, S., et al., *Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone*. J Clin Invest, 1996. **97**(8): p. 1916-23.
440. Zalba, G., et al., *Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase*. Hypertension, 2001. **38**(6): p. 1395-9.
441. Mohazzab, K.M., P.M. Kaminski, and M.S. Wolin, *NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium*. Am J Physiol, 1994. **266**(6 Pt 2): p. H2568-72.
442. Griendling, K.K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai, *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. Circ Res, 2000. **86**(5): p. 494-501.
443. Boveris, A. and B. Chance, *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen*. Biochem J, 1973. **134**(3): p. 707-16.
444. Cosentino, F. and T.F. Luscher, *Tetrahydrobiopterin and endothelial function*. Eur Heart J, 1998. **19 Suppl G**: p. G3-8.
445. Landmesser, U., et al., *Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension*. J Clin Invest, 2003. **111**(8): p. 1201-9.
446. Mollnau, H., et al., *Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling*. Circ Res, 2002. **90**(4): p. E58-65.

447. Hong, H.J., et al., *Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 2001. **38**(5): p. 1044-8.
448. Johnson, F.K., et al., *Arginase inhibition restores arteriolar endothelial function in Dahl rats with salt-induced hypertension*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **288**(4): p. R1057-62.
449. Zhang, C., et al., *Upregulation of vascular arginase in hypertension decreases nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles*. Hypertension, 2004. **44**(6): p. 935-43.
450. Milstien, S. and Z. Katusic, *Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **263**(3): p. 681-4.
451. Higashi, Y., et al., *Tetrahydrobiopterin enhances forearm vascular response to acetylcholine in both normotensive and hypertensive individuals*. Am J Hypertens, 2002. **15**(4 Pt 1): p. 326-32.
452. Drexler, H., et al., *Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine*. Lancet, 1991. **338**(8782-8783): p. 1546-50.
453. Wever, R.M., et al., *Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **237**(2): p. 340-4.
454. Rossitch, E., Jr., et al., *L-arginine normalizes endothelial function in cerebral vessels from hypercholesterolemic rabbits*. J Clin Invest, 1991. **87**(4): p. 1295-9.
455. Vallance, P., et al., *Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis*. J Cardiovasc Pharmacol, 1992. **20 Suppl 12**: p. S60-2.
456. Vallance, P., et al., *Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure*. Lancet, 1992. **339**(8793): p. 572-5.
457. Surdacki, A., et al., *Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension*. J Cardiovasc Pharmacol, 1999. **33**(4): p. 652-8.

458. Takiuchi, S., et al., *Plasma asymmetric dimethylarginine and coronary and peripheral endothelial dysfunction in hypertensive patients*. Am J Hypertens, 2004. **17**(9): p. 802-8.
459. Li, H., et al., *Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs*. Nitric Oxide, 2002. **7**(3): p. 149-64.
460. Vaziri, N.D., Z. Ni, and F. Oveisi, *Upregulation of renal and vascular nitric oxide synthase in young spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 1998. **31**(6): p. 1248-54.
461. Dai, Z.K., et al., *Upregulation of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 in pulmonary hypertension secondary to heart failure in aorta-banded rats*. Pediatr Pulmonol, 2004. **37**(3): p. 249-56.
462. Schulz, E., et al., *Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(6): p. 1115-26.
463. Montezano, A.C. and R.M. Touyz, *Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2012. **110**(1): p. 87-94.
464. Fukui, T., et al., *p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats*. Circ Res, 1997. **80**(1): p. 45-51.
465. Zalba, G., et al., *Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 2000. **35**(5): p. 1055-61.
466. Zhang, H., et al., *Angiotensin II-induced superoxide anion generation in human vascular endothelial cells: role of membrane-bound NADH-/NADPH-oxidases*. Cardiovasc Res, 1999. **44**(1): p. 215-22.
467. Munzel, T., et al., *Role for NADPH/NADH oxidase in the modulation of vascular tone*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **874**: p. 386-400.
468. Ushio-Fukai, M., et al., *p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(38): p. 23317-21.

469. Murdoch, C.E., et al., *Role of endothelial Nox2 NADPH oxidase in angiotensin II-induced hypertension and vasomotor dysfunction*. Basic Res Cardiol, 2011. **106**(4): p. 527-38.
470. Xu, S. and R.M. Touyz, *Reactive oxygen species and vascular remodelling in hypertension: still alive*. Can J Cardiol, 2006. **22**(11): p. 947-51.
471. Landmesser, U., et al., *Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II*. Hypertension, 2002. **40**(4): p. 511-5.
472. Chen, X., et al., *Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR*. Hypertension, 2001. **38**(3 Pt 2): p. 606-11.
473. Park, J.B., et al., *Chronic treatment with a superoxide dismutase mimetic prevents vascular remodeling and progression of hypertension in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. Am J Hypertens, 2002. **15**(1 Pt 1): p. 78-84.
474. Rey, F.E., et al., *Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O(2)(-) and systolic blood pressure in mice*. Circ Res, 2001. **89**(5): p. 408-14.
475. Feletou, M. and P.M. Vanhoutte, *Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture)*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(3): p. H985-1002.
476. Rubanyi, G.M. and P.M. Vanhoutte, *Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle*. Am J Physiol, 1986. **250**(5 Pt 2): p. H815-21.
477. Radi, R., *Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(12): p. 4003-8.
478. Zalba, G., et al., *Is the balance between nitric oxide and superoxide altered in spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction?* Nephrol Dial Transplant, 2001. **16 Suppl 1**: p. 2-5.
479. Bachschmid, M., et al., *Endothelial cell activation by endotoxin involves superoxide/NO-mediated nitration of prostacyclin synthase and thromboxane receptor stimulation*. FASEB J, 2003. **17**(8): p. 914-6.

480. Zou, M., C. Martin, and V. Ullrich, *Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite*. Biol Chem, 1997. **378**(7): p. 707-13.
481. Zou, M.H., R. Cohen, and V. Ullrich, *Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus*. Endothelium, 2004. **11**(2): p. 89-97.
482. Larsen, B.T., et al., *Hydrogen peroxide inhibits cytochrome p450 epoxygenases: interaction between two endothelium-derived hyperpolarizing factors*. Circ Res, 2008. **102**(1): p. 59-67.
483. Zou, M.H., C. Shi, and R.A. Cohen, *Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite*. J Clin Invest, 2002. **109**(6): p. 817-26.
484. Zou, M.H., C. Shi, and R.A. Cohen, *High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin H(2) receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells*. Diabetes, 2002. **51**(1): p. 198-203.
485. Loot, A.E., et al., *Angiotensin II impairs endothelial function via tyrosine phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase*. J Exp Med, 2009. **206**(13): p. 2889-96.
486. MacMillan-Crow, L.A., J.P. Crow, and J.A. Thompson, *Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues*. Biochemistry, 1998. **37**(6): p. 1613-22.
487. Munzel, T., et al., *Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(8): p. 1551-7.
488. Price, D.T., J.A. Vita, and J.F. Keaney, Jr., *Redox control of vascular nitric oxide bioavailability*. Antioxid Redox Signal, 2000. **2**(4): p. 919-35.
489. Brakemeier, S., et al., *Modulation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in renal artery endothelium in situ by nitric oxide and reactive oxygen species*. Kidney Int, 2003. **64**(1): p. 199-207.

490. Cai, S. and R. Sauve, *Effects of thiol-modifying agents on a  $K(Ca^{2+})$  channel of intermediate conductance in bovine aortic endothelial cells*. J Membr Biol, 1997. **158**(2): p. 147-58.
491. Kusama, N., et al., *Reduced hyperpolarization in endothelial cells of rabbit aortic valve following chronic nitroglycerine administration*. Br J Pharmacol, 2005. **146**(4): p. 487-97.
492. Hilgers, R.H. and R.C. Webb, *Reduced expression of SKCa and IKCa channel proteins in rat small mesenteric arteries during angiotensin II-induced hypertension*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(5): p. H2275-84.
493. Bussemaker, E., et al., *Aged spontaneously hypertensive rats exhibit a selective loss of EDHF-mediated relaxation in the renal artery*. Hypertension, 2003. **42**(4): p. 562-8.
494. Dal-Ros, S., et al., *Angiotensin II-induced hypertension is associated with a selective inhibition of endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in the rat mesenteric artery*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **328**(2): p. 478-86.
495. Giachini, F.R., et al., *Upregulation of intermediate calcium-activated potassium channels counterbalance the impaired endothelium-dependent vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. Transl Res, 2009. **154**(4): p. 183-93.
496. Fujii, K., et al., *Decreased endothelium-dependent hyperpolarization to acetylcholine in smooth muscle of the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats*. Circ Res, 1992. **70**(4): p. 660-9.
497. Weston, A.H., et al., *Impairment of endothelial SK(Ca) channels and of downstream hyperpolarizing pathways in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(4): p. 836-43.
498. Liu, Y., et al., *Peroxynitrite reduces the endothelium-derived hyperpolarizing factor component of coronary flow-mediated dilation in PECAM-1-knockout mice*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006. **290**(1): p. R57-65.
499. Ma, X., et al., *Inhibition of superoxide anion-mediated impairment of endothelium by treatment with luteolin and apigenin in rat mesenteric artery*. Life Sci, 2008. **83**(3-4): p. 110-7.
500. Rubanyi, G.M. and P.M. Vanhoutte, *Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor*. Am J Physiol, 1986. **250**(5 Pt 2): p. H822-7.



501. Cogolludo, A., et al., *Role of reactive oxygen species in Kv channel inhibition and vasoconstriction induced by TP receptor activation in rat pulmonary arteries*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1091**: p. 41-51.
502. Michelakis, E.D., et al., *O<sub>2</sub> sensing in the human ductus arteriosus: regulation of voltage-gated K<sup>+</sup> channels in smooth muscle cells by a mitochondrial redox sensor*. Circ Res, 2002. **91**(6): p. 478-86.
503. Tang, X.D., et al., *Reactive oxygen species impair Slo1 BK channel function by altering cysteine-mediated calcium sensing*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(2): p. 171-8.
504. Wang, Z.W., et al., *Redox regulation of large conductance Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels in smooth muscle cells*. J Gen Physiol, 1997. **110**(1): p. 35-44.
505. Liu, Y. and D.D. Gutterman, *Oxidative stress and potassium channel function*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2002. **29**(4): p. 305-11.
506. Ellis, A. and C.R. Triggle, *Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone*. Can J Physiol Pharmacol, 2003. **81**(11): p. 1013-28.
507. Kansui, Y., et al., *Angiotensin II receptor blockade corrects altered expression of gap junctions in vascular endothelial cells from hypertensive rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(1): p. H216-24.
508. Rummery, N.M., et al., *Decreased endothelial size and connexin expression in rat caudal arteries during hypertension*. J Hypertens, 2002. **20**(2): p. 247-53.
509. Griffith, T.M., et al., *5-Methyltetrahydrofolate and tetrahydrobiopterin can modulate electrotonically mediated endothelium-dependent vascular relaxation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(19): p. 7008-13.
510. Yang, D., et al., *Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats*. Br J Pharmacol, 2002. **136**(1): p. 104-10.
511. Cosentino, F., J.C. Sill, and Z.S. Katusic, *Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions*. Hypertension, 1994. **23**(2): p. 229-35.
512. Warner, T.D. and J.A. Mitchell, *Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic*. FASEB J, 2004. **18**(7): p. 790-804.

513. Viridis, A., et al., *Cyclooxygenase-1 is involved in endothelial dysfunction of mesenteric small arteries from angiotensin II-infused mice*. Hypertension, 2007. **49**(3): p. 679-86.
514. Francois, H., et al., *Role for thromboxane receptors in angiotensin-II-induced hypertension*. Hypertension, 2004. **43**(2): p. 364-9.
515. Gao, Y. and P.M. Vanhoutte, *Products of cyclooxygenase mediate the responses of the guinea pig trachea to hydrogen peroxide*. J Appl Physiol (1985), 1993. **74**(5): p. 2105-11.
516. Pratico, D., et al., *The isoprostanes in biology and medicine*. Trends Endocrinol Metab, 2001. **12**(6): p. 243-7.
517. Sametz, W., et al., *Formation of 8-iso-PGF(2 $\alpha$ ) and thromboxane A(2) by stimulation with several activators of phospholipase A(2) in the isolated human umbilical vein*. Br J Pharmacol, 2000. **131**(1): p. 145-51.
518. Hoffman, S.W., S. Moore, and E.F. Ellis, *Isoprostanes: free radical-generated prostaglandins with constrictor effects on cerebral arterioles*. Stroke, 1997. **28**(4): p. 844-9.
519. Tang, E.H., et al., *Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor*. Br J Pharmacol, 2007. **151**(1): p. 15-23.
520. Wolin, M.S., *Interactions of oxidants with vascular signaling systems*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(6): p. 1430-42.
521. Shen, J.Z., X.F. Zheng, and C.Y. Kwan, *Evidence for P(2)-purinoceptors contribution in H(2)O(2)-induced contraction of rat aorta in the absence of endothelium*. Cardiovasc Res, 2000. **47**(3): p. 574-85.
522. Greenwood, I.A., et al., *Modulation of ICl(Ca) in vascular smooth muscle cells by oxidizing and cysteine-reactive reagents*. Pflugers Arch, 2002. **443**(3): p. 473-82.
523. Gao, Q., et al., *Mitochondrial-derived hydrogen peroxide inhibits relaxation of bovine coronary arterial smooth muscle to hypoxia through stimulation of ERK MAP kinase*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(6): p. H2262-9.

524. Gupte, S.A., et al., *Peroxide generation by p47phox-Src activation of Nox2 has a key role in protein kinase C-induced arterial smooth muscle contraction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **296**(4): p. H1048-57.
525. Cai, H., *Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences*. Cardiovasc Res, 2005. **68**(1): p. 26-36.
526. Wei, E.P., H.A. Kontos, and J.S. Beckman, *Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite*. Am J Physiol, 1996. **271**(3 Pt 2): p. H1262-6.
527. Shimokawa, H. and T. Matoba, *Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor*. Pharmacol Res, 2004. **49**(6): p. 543-9.
528. Kontos, H.A., et al., *Oxygen radicals mediate the cerebral arteriolar dilation from arachidonate and bradykinin in cats*. Circ Res, 1984. **55**(3): p. 295-303.
529. Yang, S.T., et al., *Mechanisms of impaired endothelium-dependent cerebral vasodilatation in response to bradykinin in hypertensive rats*. Stroke, 1991. **22**(9): p. 1177-82.
530. Miura, H., et al., *Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles*. Circ Res, 2003. **92**(2): p. e31-40.
531. Edwards, D.H., Y. Li, and T.M. Griffith, *Hydrogen peroxide potentiates the EDHF phenomenon by promoting endothelial Ca<sup>2+</sup> mobilization*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(10): p. 1774-81.
532. Gluais, P., et al., *Hydrogen peroxide and endothelium-dependent hyperpolarization in the guinea-pig carotid artery*. Eur J Pharmacol, 2005. **513**(3): p. 219-24.
533. Ellis, A., et al., *Catalase has negligible inhibitory effects on endothelium-dependent relaxations in mouse isolated aorta and small mesenteric artery*. Br J Pharmacol, 2003. **140**(7): p. 1193-200.
534. Chaytor, A.T., et al., *Distinct hyperpolarizing and relaxant roles for gap junctions and endothelium-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in NO-independent relaxations of rabbit arteries*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 15212-7.
535. Trebak, M., et al., *Interplay between calcium and reactive oxygen/nitrogen species: an essential paradigm for vascular smooth muscle signaling*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(5): p. 657-74.

536. Hu, Q., et al., *Hydrogen peroxide induces intracellular calcium oscillations in human aortic endothelial cells*. *Circulation*, 1998. **97**(3): p. 268-75.
537. Elliott, S.J. and S.K. Koliwad, *Redox control of ion channel activity in vascular endothelial cells by glutathione*. *Microcirculation*, 1997. **4**(3): p. 341-7.
538. Lounsbury, K.M., Q. Hu, and R.C. Ziegelstein, *Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature*. *Free Radic Biol Med*, 2000. **28**(9): p. 1362-9.
539. Dreher, D. and A.F. Junod, *Differential effects of superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical on intracellular calcium in human endothelial cells*. *J Cell Physiol*, 1995. **162**(1): p. 147-53.
540. Dreher, D., L. Jornot, and A.F. Junod, *Effects of hypoxanthine-xanthine oxidase on  $Ca^{2+}$  stores and protein synthesis in human endothelial cells*. *Circ Res*, 1995. **76**(3): p. 388-95.
541. Graier, W.F., et al., *Effects of superoxide anions on endothelial  $Ca^{2+}$  signaling pathways*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(9): p. 1470-9.
542. Elliott, S.J., *Peroxynitrite modulates receptor-activated  $Ca^{2+}$  signaling in vascular endothelial cells*. *Am J Physiol*, 1996. **270**(6 Pt 1): p. L954-61.
543. Elliott, S.J. and T.N. Doan, *Oxidant stress inhibits the store-dependent  $Ca(2+)$ -influx pathway of vascular endothelial cells*. *Biochem J*, 1993. **292** ( Pt 2): p. 385-93.
544. Gen, W., et al., *Mechanisms of  $Ca^{2+}$  overload induced by extracellular  $H_2O_2$  in quiescent isolated rat cardiomyocytes*. *Basic Res Cardiol*, 2001. **96**(6): p. 623-9.
545. Wang, Y.X. and Y.M. Zheng, *ROS-dependent signaling mechanisms for hypoxic  $Ca(2+)$  responses in pulmonary artery myocytes*. *Antioxid Redox Signal*, 2010. **12**(5): p. 611-23.
546. Chaplin, N.L. and G.C. Amberg, *Hydrogen peroxide mediates oxidant-dependent stimulation of arterial smooth muscle L-type calcium channels*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012. **302**(9): p. C1382-93.
547. Tabet, F., et al., *Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004. **44**(2): p. 200-8.
548. Amberg, G.C., S. Earley, and S.A. Glapa, *Local regulation of arterial L-type calcium channels by reactive oxygen species*. *Circ Res*, 2010. **107**(8): p. 1002-10.

549. Yang, Z., et al., *Hydrogen peroxide-induced endothelium-dependent relaxation of rat aorta involvement of  $\text{Ca}^{2+}$  and other cellular metabolites*. Gen Pharmacol, 1999. **33**(4): p. 325-36.
550. Viridis, A., E. Duranti, and S. Taddei, *Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension: Role of Angiotensin II*. Int J Hypertens, 2011. **2011**: p. 916310.
551. Taddei, S., et al., *Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation by restoring nitric oxide activity in essential hypertension*. Circulation, 1998. **97**(22): p. 2222-9.
552. Dremina, E.S., et al., *Oxidation and inactivation of SERCA by selective reaction of cysteine residues with amino acid peroxides*. Chem Res Toxicol, 2007. **20**(10): p. 1462-9.
553. Zheng, Y. and X. Shen,  *$\text{H}_2\text{O}_2$  directly activates inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in endothelial cells*. Redox Rep, 2005. **10**(1): p. 29-36.
554. Hu, Q., et al., *NADPH oxidase activation increases the sensitivity of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores to inositol 1,4,5-trisphosphate in human endothelial cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 15749-57.
555. Bootman, M.D., C.W. Taylor, and M.J. Berridge, *The thiol reagent, thimerosal, evokes  $\text{Ca}^{2+}$  spikes in HeLa cells by sensitizing the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor*. J Biol Chem, 1992. **267**(35): p. 25113-9.
556. Swann, K., *Thimerosal causes calcium oscillations and sensitizes calcium-induced calcium release in unfertilized hamster eggs*. FEBS Lett, 1991. **278**(2): p. 175-8.
557. Sun, L., et al., *Effect of hydrogen peroxide and superoxide anions on cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$ : comparison of endothelial cells from large-sized and small-sized arteries*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25432.
558. Volk, T., M. Hensel, and W.J. Kox, *Transient  $\text{Ca}^{2+}$  changes in endothelial cells induced by low doses of reactive oxygen species: role of hydrogen peroxide*. Mol Cell Biochem, 1997. **171**(1-2): p. 11-21.
559. Galan, C., et al., *Role of oxidant scavengers in the prevention of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis disorders*. Molecules, 2010. **15**(10): p. 7167-87.
560. Grover, A.K., S.E. Samson, and C.M. Misquitta, *Sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pump isoform SERCA3 is more resistant than SERCA2b to peroxide*. Am J Physiol, 1997. **273**(2 Pt 1): p. C420-5.

561. Grover, A.K. and S.E. Samson, *Peroxide resistance of ER Ca<sup>2+</sup> pump in endothelium: implications to coronary artery function*. Am J Physiol, 1997. **273**(4 Pt 1): p. C1250-8.
562. Barnes, K.A., S.E. Samson, and A.K. Grover, *Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-pump isoform SERCA3a is more resistant to superoxide damage than SERCA2b*. Mol Cell Biochem, 2000. **203**(1-2): p. 17-21.
563. Dickhout, J.G., et al., *Peroxyne nitrite causes endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human vascular endothelium: implications in atherogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(12): p. 2623-9.
564. Xu, K.Y., J.L. Zweier, and L.C. Becker, *Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase function by direct attack on the ATP binding site*. Circ Res, 1997. **80**(1): p. 76-81.
565. Goldhaber, J.I., *Free radicals enhance Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in ventricular myocytes*. Am J Physiol, 1996. **271**(3 Pt 2): p. H823-33.
566. Coetzee, W.A., H. Ichikawa, and D.J. Hearse, *Oxidant stress inhibits Na-Ca-exchange current in cardiac myocytes: mediation by sulfhydryl groups?* Am J Physiol, 1994. **266**(3 Pt 2): p. H909-19.
567. Jornot, L., et al., *Reactive oxygen metabolites increase mitochondrial calcium in endothelial cells: implication of the Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> exchanger*. J Cell Sci, 1999. **112** ( Pt 7): p. 1013-22.
568. Groschner, K., et al., *Trp proteins form store-operated cation channels in human vascular endothelial cells*. FEBS Lett, 1998. **437**(1-2): p. 101-6.
569. Poteser, M., et al., *TRPC3 and TRPC4 associate to form a redox-sensitive cation channel. Evidence for expression of native TRPC3-TRPC4 heteromeric channels in endothelial cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(19): p. 13588-95.
570. Balzer, M., B. Lintschinger, and K. Groschner, *Evidence for a role of Trp proteins in the oxidative stress-induced membrane conductances of porcine aortic endothelial cells*. Cardiovasc Res, 1999. **42**(2): p. 543-9.
571. McCormack, J.G. and R.M. Denton, *Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport and the role of intramitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the regulation of energy metabolism*. Dev Neurosci, 1993. **15**(3-5): p. 165-73.

572. Hansford, R.G. and D. Zorov, *Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation*. Mol Cell Biochem, 1998. **184**(1-2): p. 359-69.
573. Banfi, B., et al., *Mechanism of Ca<sup>2+</sup> activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5)*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18583-91.
574. BelAiba, R.S., et al., *NOX5 variants are functionally active in endothelial cells*. Free Radic Biol Med, 2007. **42**(4): p. 446-59.
575. Banfi, B., et al., *A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes*. J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37594-601.
576. Fulton, D.J., *Nox5 and the regulation of cellular function*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(10): p. 2443-52.
577. Montezano, A.C., et al., *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced oxidase 5 (Nox5) regulation by angiotensin II and endothelin-1 is mediated via calcium/calmodulin-dependent, rac-1-independent pathways in human endothelial cells*. Circ Res, 2010. **106**(8): p. 1363-73.
578. Guzik, T.J., et al., *Calcium-dependent NOX5 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase contributes to vascular oxidative stress in human coronary artery disease*. J Am Coll Cardiol, 2008. **52**(22): p. 1803-9.
579. Carter, T.D., et al., *Regulation of P2y-purinoreceptor-mediated prostacyclin release from human endothelial cells by cytoplasmic calcium concentration*. Br J Pharmacol, 1988. **95**(4): p. 1181-90.
580. Long, C., et al., *Removal of FKBP12/12.6 from endothelial ryanodine receptors leads to an intracellular calcium leak and endothelial dysfunction*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(7): p. 1580-6.
581. Estrada, I.A., et al., *STIM1 restores coronary endothelial function in type 1 diabetic mice*. Circ Res, 2012. **111**(9): p. 1166-75.
582. Versari, D., et al., *Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension*. Br J Pharmacol, 2009. **157**(4): p. 527-36.
583. Gluais, P., et al., *Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin*. Br J Pharmacol, 2005. **146**(6): p. 834-45.

584. Gluais, P., et al., *In SHR aorta, calcium ionophore A-23187 releases prostacyclin and thromboxane A2 as endothelium-derived contracting factors*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(5): p. H2255-64.
585. Yang, D., et al., *Endothelium-dependent contractions to acetylcholine, ATP and the calcium ionophore A 23187 in aortas from spontaneously hypertensive and normotensive rats*. Fundam Clin Pharmacol, 2004. **18**(3): p. 321-6.
586. Wise, H. and R.L. Jones, *Focus on prostacyclin and its novel mimetics*. Trends Pharmacol Sci, 1996. **17**(1): p. 17-21.
587. Rapoport, R.M. and S.P. Williams, *Role of prostaglandins in acetylcholine-induced contraction of aorta from spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats*. Hypertension, 1996. **28**(1): p. 64-75.
588. Numaguchi, Y., et al., *Altered gene expression of prostacyclin synthase and prostacyclin receptor in the thoracic aorta of spontaneously hypertensive rats*. Cardiovasc Res, 1999. **41**(3): p. 682-8.
589. Mountian, I.I., et al., *Expression of Ca(2+) Transport Genes in Platelets and Endothelial Cells in Hypertension*. Hypertension, 2001. **37**(1): p. 135-141.
590. Gao, F. and D.H. Wang, *Impairment in function and expression of transient receptor potential vanilloid type 4 in Dahl salt-sensitive rats: significance and mechanism*. Hypertension, 2010. **55**(4): p. 1018-25.
591. Lytton, J., et al., *Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps*. J Biol Chem, 1992. **267**(20): p. 14483-9.
592. Liu, D., et al., *Increased transient receptor potential channel TRPC3 expression in spontaneously hypertensive rats*. Am J Hypertens, 2005. **18**(11): p. 1503-7.
593. Dietrich, A., et al., *Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6-/- mice*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(16): p. 6980-9.
594. Widlansky, M.E., et al., *The clinical implications of endothelial dysfunction*. J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(7): p. 1149-60.
595. Hadi, H.A., C.S. Carr, and J. Al Suwaidi, *Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome*. Vasc Health Risk Manag, 2005. **1**(3): p. 183-98.



596. Luscher, T.F., L. Raij, and P.M. Vanhoutte, *Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats*. Hypertension, 1987. **9**(2): p. 157-63.
597. Konishi, M. and C. Su, *Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries*. Hypertension, 1983. **5**(6): p. 881-6.
598. Lockette, W., Y. Otsuka, and O. Carretero, *The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension*. Hypertension, 1986. **8**(6 Pt 2): p. II61-6.
599. Garg, R. and S. Yusuf, *Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. Collaborative Group on ACE Inhibitor Trials*. JAMA, 1995. **273**(18): p. 1450-6.
600. Zaman, M.A., S. Oparil, and D.A. Calhoun, *Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(8): p. 621-36.
601. Dzau, V.J., *Local expression and pathophysiological role of renin-angiotensin in the blood vessels and heart*. Basic Res Cardiol, 1993. **88 Suppl 1**: p. 1-14.
602. Danser, A.H., et al., *Is there a local renin-angiotensin system in the heart?* Cardiovasc Res, 1999. **44**(2): p. 252-65.
603. Dzau, V.J., *Significance of the vascular renin-angiotensin pathway*. Hypertension, 1986. **8**(7): p. 553-9.
604. Dzau, V.J., *Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis*. Hypertension, 2001. **37**(4): p. 1047-52.
605. Saye, J.A., H.A. Singer, and M.J. Peach, *Role of endothelium in conversion of angiotensin I to angiotensin II in rabbit aorta*. Hypertension, 1984. **6**(2 Pt 1): p. 216-21.
606. Admiraal, P.J., et al., *Metabolism and production of angiotensin I in different vascular beds in subjects with hypertension*. Hypertension, 1990. **15**(1): p. 44-55.
607. Kifor, I. and V.J. Dzau, *Endothelial renin-angiotensin pathway: evidence for intracellular synthesis and secretion of angiotensins*. Circ Res, 1987. **60**(3): p. 422-8.
608. Wolny, A., et al., *Functional and biochemical analysis of angiotensin II-forming pathways in the human heart*. Circ Res, 1997. **80**(2): p. 219-27.
609. Crackower, M.A., et al., *Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function*. Nature, 2002. **417**(6891): p. 822-8.

610. Santos, R.A., M.J. Campagnole-Santos, and S.P. Andrade, *Angiotensin-(1-7): an update*. Regul Pept, 2000. **91**(1-3): p. 45-62.
611. Iyer, S.N., et al., *Contribution of angiotensin-(1-7) to blood pressure regulation in salt-depleted hypertensive rats*. Hypertension, 2000. **36**(3): p. 417-22.
612. Ferrario, C.M., et al., *Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis*. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(9): p. 1716-22.
613. Lima, C.V., et al., *Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by short-term infusion of angiotensin-(1-7) in normotensive and hypertensive rats*. Hypertension, 1997. **30**(3 Pt 2): p. 542-8.
614. Li, P., et al., *Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide*. Hypertension, 1997. **29**(1 Pt 2): p. 394-400.
615. Ruilope, L.M., J. Redon, and R. Schmieder, *Cardiovascular risk reduction by reversing endothelial dysfunction: ARBs, ACE inhibitors, or both? Expectations from the ONTARGET Trial Programme*. Vasc Health Risk Manag, 2007. **3**(1): p. 1-9.
616. de Gasparo, M., et al., *International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(3): p. 415-72.
617. Stoll, M., et al., *The angiotensin AT<sub>2</sub>-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells*. J Clin Invest, 1995. **95**(2): p. 651-7.
618. Wiemer, G., et al., *The possible role of angiotensin II subtype AT<sub>2</sub> receptors in endothelial cells and isolated ischemic rat hearts*. J Hypertens Suppl, 1993. **11**(5): p. S234-5.
619. Audoly, L.P., M.I. Oliverio, and T.M. Coffman, *Insights into the functions of type 1 (AT<sub>1</sub>) angiotensin II receptors provided by gene targeting*. Trends Endocrinol Metab, 2000. **11**(7): p. 263-9.
620. Criscione, L., et al., *Binding characteristics and vascular effects of various angiotensin II antagonists*. J Cardiovasc Pharmacol, 1990. **16** Suppl 4: p. S56-9.
621. Griendling, K.K., et al., *Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts*. Hypertension, 1997. **29**(1 Pt 2): p. 366-73.
622. Pueyo, M.E., N. N'Diaye, and J.B. Michel, *Angiotensin II-elicited signal transduction via AT<sub>1</sub> receptors in endothelial cells*. Br J Pharmacol, 1996. **118**(1): p. 79-84.

623. Saito, S., et al., *Angiotensin II activates endothelial constitutive nitric oxide synthase via AT1 receptors*. Hypertens Res, 1996. **19**(3): p. 201-6.
624. Suzuki, H., et al., *Activation of endothelial nitric oxide synthase by the angiotensin II type I receptor*. Endocrinology, 2006. **147**(12): p. 5914-20.
625. Hennington, B.S., et al., *Angiotensin II stimulates synthesis of endothelial nitric oxide synthase*. Hypertension, 1998. **31**(1 Pt 2): p. 283-8.
626. Cai, H., et al., *NAD(P)H oxidase-derived hydrogen peroxide mediates endothelial nitric oxide production in response to angiotensin II*. J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48311-7.
627. Thomas, S.R., K. Chen, and J.F. Keaney, Jr., *Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 6017-24.
628. Zhang, C., et al., *Divergent roles of angiotensin II AT1 and AT2 receptors in modulating coronary microvascular function*. Circ Res, 2003. **92**(3): p. 322-9.
629. Boulanger, C.M., L. Caputo, and B.I. Levy, *Endothelial AT1-mediated release of nitric oxide decreases angiotensin II contractions in rat carotid artery*. Hypertension, 1995. **26**(5): p. 752-7.
630. Caputo, L., et al., *Angiotensin II increases cGMP content via endothelial angiotensin II AT1 subtype receptors in the rat carotid artery*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(10): p. 1646-51.
631. Luscher, T.F., *Endothelial dysfunction: the role and impact of the renin-angiotensin system*. Heart, 2000. **84 Suppl 1**: p. i20-2:discussion i50.
632. Touyz, R.M., *Molecular and cellular mechanisms in vascular injury in hypertension: role of angiotensin II*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2005. **14**(2): p. 125-31.
633. Fyhrquist, F., K. Metsarinne, and I. Tikkanen, *Role of angiotensin II in blood pressure regulation and in the pathophysiology of cardiovascular disorders*. J Hum Hypertens, 1995. **9 Suppl 5**: p. S19-24.
634. Schiffrin, E.L., et al., *Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan*. Circulation, 2000. **101**(14): p. 1653-9.

635. Lassegue, B. and K.K. Griendling, *Reactive oxygen species in hypertension; An update*. Am J Hypertens, 2004. **17**(9): p. 852-60.
636. Desideri, G., et al., *Angiotensin II inhibits endothelial cell motility through an AT1-dependent oxidant-sensitive decrement of nitric oxide availability*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(7): p. 1218-23.
637. Prasad, A., et al., *Acute and chronic angiotensin-1 receptor antagonism reverses endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation, 2000. **101**(20): p. 2349-54.
638. Mancini, G.B., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction) Study*. Circulation, 1996. **94**(3): p. 258-65.
639. Scott-Burden, T., et al., *Induction of endothelin secretion by angiotensin II: effects on growth and synthetic activity of vascular smooth muscle cells*. J Cardiovasc Pharmacol, 1991. **17 Suppl 7**: p. S96-100.
640. Hsu, Y.H., et al., *Role of reactive oxygen species-sensitive extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in vascular endothelial cells*. J Vasc Res, 2004. **41**(1): p. 64-74.
641. Imai, T., et al., *Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells*. Hypertension, 1992. **19**(6 Pt 2): p. 753-7.
642. Kim, S. and H. Iwao, *Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(1): p. 11-34.
643. Mehta, P.K. and K.K. Griendling, *Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C82-97.
644. Nakashima, H., et al., *Angiotensin II regulates vascular and endothelial dysfunction: recent topics of Angiotensin II type-1 receptor signaling in the vasculature*. Curr Vasc Pharmacol, 2006. **4**(1): p. 67-78.
645. Timmermans, P.B., et al., *Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists*. Pharmacol Rev, 1993. **45**(2): p. 205-51.
646. Unger, T., et al., *Angiotensin receptors*. J Hypertens Suppl, 1996. **14**(5): p. S95-103.

647. Henrion, D., N. Kubis, and B.I. Levy, *Physiological and pathophysiological functions of the AT(2) subtype receptor of angiotensin II: from large arteries to the microcirculation*. Hypertension, 2001. **38**(5): p. 1150-7.
648. Heagerty, A.M., *Influence of changes of blood pressure on vascular angiotensin II receptor subtype expression*. Circulation, 2005. **111**(8): p. 956-7.
649. Hein, L., et al., *Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice*. Nature, 1995. **377**(6551): p. 744-7.
650. Gohlke, P., C. Pees, and T. Unger, *AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism*. Hypertension, 1998. **31**(1 Pt 2): p. 349-55.
651. Ichiki, T., et al., *Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor*. Nature, 1995. **377**(6551): p. 748-50.
652. Munzenmaier, D.H. and A.S. Greene, *Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure*. Hypertension, 1996. **27**(3 Pt 2): p. 760-5.
653. Carey, R.M., X.H. Jin, and H.M. Siragy, *Role of the angiotensin AT2 receptor in blood pressure regulation and therapeutic implications*. Am J Hypertens, 2001. **14**(6 Pt 2): p. 98S-102S.
654. Tsutsumi, Y., et al., *Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation*. J Clin Invest, 1999. **104**(7): p. 925-35.
655. Akishita, M., et al., *Increased vasoconstrictor response of the mouse lacking angiotensin II type 2 receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **261**(2): p. 345-9.
656. Savoia, C., et al., *Angiotensin type 2 receptor in resistance arteries of type 2 diabetic hypertensive patients*. Hypertension, 2007. **49**(2): p. 341-6.
657. Carey, R.M., et al., *Angiotensin type 2 receptor-mediated hypotension in angiotensin type-1 receptor-blocked rats*. Hypertension, 2001. **38**(6): p. 1272-7.
658. Barber, M.N., D.B. Sampey, and R.E. Widdop, *AT(2) receptor stimulation enhances antihypertensive effect of AT(1) receptor antagonist in hypertensive rats*. Hypertension, 1999. **34**(5): p. 1112-6.

659. Batenburg, W.W., et al., *Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation. Focus on bradykinin, NO and endothelium-derived hyperpolarizing factor(s)*. *Vascul Pharmacol*, 2005. **42**(3): p. 109-18.
660. Hiyoshi, H., et al., *Angiotensin type 2 receptor-mediated phosphorylation of eNOS in the aortas of mice with 2-kidney, 1-clip hypertension*. *Hypertension*, 2005. **45**(5): p. 967-73.
661. Olson, S., et al., *Angiotensin II stimulates nitric oxide production in pulmonary artery endothelium via the type 2 receptor*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. **287**(3): p. L559-68.
662. Yayama, K., et al., *Angiotensin II stimulates endothelial NO synthase phosphorylation in thoracic aorta of mice with abdominal aortic banding via type 2 receptor*. *Hypertension*, 2006. **48**(5): p. 958-64.
663. Bergaya, S., et al., *Flow-dependent dilation mediated by endogenous kinins requires angiotensin AT2 receptors*. *Circ Res*, 2004. **94**(12): p. 1623-9.
664. Abadir, P.M., et al., *Angiotensin II type 2 receptor-bradykinin B2 receptor functional heterodimerization*. *Hypertension*, 2006. **48**(2): p. 316-22.
665. AbdAlla, S., et al., *The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(43): p. 39721-6.
666. Schuijt, M.P., et al., *AT(2) receptor-mediated vasodilation in the heart: effect of myocardial infarction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **281**(6): p. H2590-6.
667. Watanabe, T., T.A. Barker, and B.C. Berk, *Angiotensin II and the endothelium: diverse signals and effects*. *Hypertension*, 2005. **45**(2): p. 163-9.
668. Yan, C., et al., *Functional interplay between angiotensin II and nitric oxide: cyclic GMP as a key mediator*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(1): p. 26-36.
669. Millatt, L.J., E.M. Abdel-Rahman, and H.M. Siragy, *Angiotensin II and nitric oxide: a question of balance*. *Regul Pept*, 1999. **81**(1-3): p. 1-10.
670. Rompe, F., et al., *Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB*. *Hypertension*, 2010. **55**(4): p. 924-31.
671. Lemarie, C.A. and E.L. Schiffrin, *The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease*. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2010. **11**(1): p. 19-31.

672. Johren, O., A. Dendorfer, and P. Dominiak, *Cardiovascular and renal function of angiotensin II type-2 receptors*. Cardiovasc Res, 2004. **62**(3): p. 460-7.
673. Martens, J.R., et al., *Angiotensin II type 2 receptor-mediated regulation of rat neuronal K<sup>+</sup> channels*. Circ Res, 1996. **79**(2): p. 302-9.
674. Zhu, M., et al., *Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal delayed-rectifier potassium current involves phospholipase A2 and arachidonic acid*. J Neurosci, 1998. **18**(2): p. 679-86.
675. Kang, J., C. Sumners, and P. Posner, *Angiotensin II type 2 receptor-modulated changes in potassium currents in cultured neurons*. Am J Physiol, 1993. **265**(3 Pt 1): p. C607-16.
676. Yusuf, S., et al., *Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators*. N Engl J Med, 2000. **342**(3): p. 145-53.
677. Prasad, A., et al., *Angiotensin type I receptor antagonism reverses abnormal coronary vasomotion in atherosclerosis*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(4): p. 1089-95.
678. Charbel, C., et al., *Functional activation of endothelial CaMKII by Ca<sup>2+</sup> microdomains*. PNAS, 2015. **Submitted**.
679. Lemieux, M., et al., *Translocation of CaMKII to dendritic microtubules supports the plasticity of local synapses*. J Cell Biol, 2012. **198**(6): p. 1055-73.
680. Toussaint, F., et al., *CaMKII regulates intracellular Ca<sup>2+</sup>(+) dynamics in native endothelial cells*. Cell Calcium, 2015. **58**(3): p. 275-85.
681. Strack, S., et al., *Translocation of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II to the postsynaptic density*. J Biol Chem, 1997. **272**(21): p. 13467-70.
682. McNeill, R.B. and R.J. Colbran, *Interaction of autophosphorylated Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II with neuronal cytoskeletal proteins. Characterization of binding to a 190-kDa postsynaptic density protein*. J Biol Chem, 1995. **270**(17): p. 10043-9.
683. Ledoux, J. and M.T. Nelson, *SK channels are involved in the stimulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> signals by reactive oxygen species (ROS) in intact endothelium*. The FASEB Journal., 2006. **20**(738.5): p. A1164-A1165.

684. Zhang, L., P. Papadopoulos, and E. Hamel, *Endothelial TRPV4 channels mediate dilation of cerebral arteries: impairment and recovery in cerebrovascular pathologies related to Alzheimer's disease*. Br J Pharmacol, 2013. **170**(3): p. 661-70.
685. Onaka, U., et al., *Antihypertensive treatment improves endothelium-dependent hyperpolarization in the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats*. Circulation, 1998. **98**(2): p. 175-82.
686. Kahonen, M., et al., *Losartan and enalapril therapies enhance vasodilatation in the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats*. Eur J Pharmacol, 1999. **368**(2-3): p. 213-22.
687. Goto, K., et al., *Renin-angiotensin system blockade improves endothelial dysfunction in hypertension*. Hypertension, 2000. **36**(4): p. 575-80.
688. Waldron, G.J., et al., *Acetylcholine-induced relaxation of peripheral arteries isolated from mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. Br J Pharmacol, 1999. **128**(3): p. 653-8.
689. Ding, H., P. Kubes, and C. Triggle, *Potassium- and acetylcholine-induced vasorelaxation in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. Br J Pharmacol, 2000. **129**(6): p. 1194-200.
690. Gutterman, D.D., H. Miura, and Y. Liu, *Redox modulation of vascular tone: focus of potassium channel mechanisms of dilation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(4): p. 671-8.
691. Morio, Y., et al., *Activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor is augmented in monocrotaline-induced pulmonary hypertension of rat lungs*. J Vasc Res, 2007. **44**(4): p. 325-35.
692. Intengan, H.D. and E.L. Schiffrin, *Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants*. Hypertension, 2000. **36**(3): p. 312-8.
693. Hald, B.O., et al., *Less is more: minimal expression of myoendothelial gap junctions optimizes cell-cell communication in virtual arterioles*. J Physiol, 2014. **592**(Pt 15): p. 3243-55.



694. Socha, M.J., et al., *Temperature effects on morphological integrity and Ca(2)(+) signaling in freshly isolated murine feed artery endothelial cell tubes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(3): p. H773-83.